ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG NEUER HASCHISCH-INHALTSSTOFFE

Analyse des Rauchkondensats sowie Versuche zum Nachweis von Cannabinoiden in biologischen Flüssigkeiten

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Jürgen Friedrich-Fiechtl
aus Attersee/Österreich

Göttingen 1974

ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG NEUER HASCHISCH-INHALTSSTOFFE

Analyse des Rauchkondensats sowie Versuche zum Nachweis von Cannabinoiden in biologischen Flüssigkeiten

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Jürgen Friedrich-Fiechtl
aus Attersee/Österreich

Göttingen 1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent : Professor Dr. G. Spiteller

Korreferent : Professor Dr. U. Schöllkopf

Tag der mündlichen Prüfung : 2. Mai 1974

Die vorliegende Arbeit wurde im Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen in der Zeit von Januar 1971 bis Dezember 1973 unter Anleitung von Professor Dr. G. Spiteller ausgeführt.

Herrn Professor Dr. G. Spiteller danke ich für die Aufgabenstellung, sein Interesse am Fortgang der Arbeit und vor allem für seine stete Hilfsbereitschaft.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534919_0060

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

THEORETISCHER TEIL

Einleitung 1

Problemstellung und Zielsetzung 2

A. Isolation und Strukturaufklärung einiger neuer Cannabinoide aus Haschisch

1. Bisherige Untersuchungsergebnisse 4

2. Zur Zählweise und Klassifizierung 5

3. Tabelle der natürlichen Cannabinoide (1973) 6

4. Chromatographische Übersichtsanalyse 9

4.1 Dünnschichtchromatographie-Massenspektrometrie (DC/MS) 9

4.2 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS) 11

4.3 Kapillargaschromatographische Trennung von Cannabinoiden 13

5. Die Verbindung mit dem MG 328(I) aus dem Peak 4 16

5.1 Fragmentierungsschema der Verbindung (I) 17

5.2 Weitere spektroskopische Befunde der Verbindung (I) 18

5.3 Derivatisierung von (I) 19

6. Die Verbindung mit dem MG 332 (II) 25

6.1 Fragmentierungsschema der Verbindung (II) 26

6.2 Derivatisierung von (II) 27

Seite

7. Die Verbindung mit dem MG 310 (III) aus dem Peak 7 31

7.1 Fragmentierungsschema der Verbindung (III) 33

7.2 Derivatisierung von (III) 33

7.3 Das Kernresonanzspektrum von (III) 34

8. Die Verbindung mit dem MG 326 (IV) aus dem Peak 4 36

8.1 Fragmentierungsschema der Verbindung (IV) 36

9. Die Verbindung mit dem MG 328 (V) aus dem Peak 7 38

9.1 Fragmentierungsschema der Verbindung (V) 39

9.2 Weitere spektroskopische Befunde der Verbindung (V) 40

9.3 Derivatisierung von (V) 41

9.4 Fragmentierungsschema des Hydrierungsproduktes von (V) 45

10. Die Verbindung mit dem MG 308 (VI) 46

10.1 Fragmentierungsschema der Verbindung (VI) 47

11. Die Verbindung mit dem MG 324 (VII) aus dem Peak 5 48

11.1 Fragmentierungsschema der Verbindung (VII) 48

12. Cannabielsoin-I (VIII) und die Verbindung (IX) 51

12.1 Fragmentierungsschema der Verbindung (IX) 53

13. Die Verbindung mit dem MG 310 (X) aus dem Peak 5 54

13.1 Fragmentierungsschema der Verbindung (X) 55

14. Die Verbindung mit dem MG 328 (XI) aus dem Peak 6 56

15. Die Verbindung mit dem MG 326 (XII) aus dem Peak 5 57

16. Cannabichromen (XIII) 59

Seite

17. Die Verbindung mit dem MG 312 (XIV) 63

18. Cannabivarol (XV) 64

19. Tetrahydrocannabivarol (XVI) 65

20. Weitere Cannabinoide im Haschisch (XVII-XX) 68

B. Cannabinoide im Rauchkondensat nach dem Rauchen von Haschisch

1. Bisherige Untersuchungsergebnisse 69

2. Problemstellung und Zielsetzung 70

3. Durchführung des Rauchversuchs 71

4. Analyse des Rauchkondensats 71

C Zum Nachweis von Cannabinoiden im Urin und Speichel nach Haschischkonsum

1. Bisherige Untersuchungsergebnisse 75

2. Problemstellung und Zielsetzung 76

3. Durchführung der Urinuntersuchungen 76

4. Ergebnisse der Urinuntersuchungen 77

5. Der Dansyl-Nachweis von Cannabinoiden im Urin und Speichel 77

Zusammenfassung 81

EXPERIMENTELLER TEIL Seite

I Übersichtsanalysen der Haschischproben

1. Extraktion von Haschisch 86

2. Gaschromatographie-Massenspektrometrie 87

2.1 Tab. 1 : Ergebnisse der GC/MS-Analyse 88

3. Dünnschichtchromatographie 89

3.1 Identifikation der Zonen 89

3.2 Ergebnisse der DC-Trennung 90

4. Glaskapillar-GC 91

II Isolierung der Verbindungen

1. Präparative Gaschromatographie 92

1.1 Behandlung, Belegung und Wartung der Säulen 92

2. Präparative Dünnschichtchromatographie 93

2.1 Ergebnis der Präparativen DC 94

III Charakteristik der Verbindungen 97

IV Herstellung der Derivate

1. Trimethylsilyläther 101

2. Phenolacetate 102

3. Methyläther 102

4. Hydrierungen 102

V. Rauchversuche 103

Seite

VI Untersuchungen von Urin und Speichel

1. Extraktion des Urins 104
2. Verseifung des Urins 104
3. Aufarbeitung der Extrakte 105
4. Chromatographie 105
5. Dansyl-Verfahren 106
   5.1 Darstellung der Dansyl-Derivate 106
   5.2 Bedingungen für die Spektren der Dansyl-Derivate 107

VII Zur Aufnahme der Massenspektren 108

Literaturverzeichnis 109

Verzeichnis der Abbildungen

Abb.		Seite
1	Dünnschichtchromatogramm des Cyclohexan-Extraktes vom Schwarzen Afghan (Verfahren nach Korte und Sieper)	10
2a	Gaschromatogramm des Cyclohexan-Extraktes vom Grünen Afghan	12
2b	Gaschromatogramm des Cyclohexan-Extraktes vom Schwarzen Afghan	12
2c	Gaschromatogramm des Methanol-Extraktes eines bereits mit Cyclohexan ausgezogenen Grünen Afghan	12
3	Massenspektrum des Peaks 4 vom Gaschromatogramm des Cyclohexan-Extraktes vom Grünen Afghan [Abb. 2 a]	13
4	Kapillar-GC des Cyclohexan-Extraktes vom Grünen Afghan	14
5	Massenspektrum der Verbindung mit dem MG 328 (I) aus Peak 4 des GC vom Grünen Afghan [Abb. 2 a]	14
6a	NMR-Spektrum der Verbindung mit dem MG 328 (I)	21
b	NMR-Spektrum von Δ^1-Tetrahyrocannabinol (Δ^1-THC)	21
c	NMR-Spektrum von Cannabidiol (CBD)	21
7	Massenspektrum des Acetylierungsproduktes der Verbindung mit dem MG 328 (I)	22
8	Massenspektrum des Hydrierungsproduktes der Verbindung mit dem MG 328 (I)	22
9	Massenspektrum der Verbindung mit dem MG 332 (II) aus Peak 4 des GC vom Grünen Afghan	26
10	Massenspektrum des Methyläthers von (II)	27
11	Massenspektrum des CBN	32
12	Massenspektrum der Verbindung mit dem MG 310 (III)	32
13	NMR-Spektrum der Verbindung mit dem MG 310 (III)	35
14	NMR-Spektrum von Cannabinol (CBN)	35
15	Massenspektrum der Verbindung mit dem MG 326 (IV) aus dem Peak 4 des GC (Abb. 2a und b)	37

Abb.		Seite
16	Massenspektrum der Verbindung mit dem MG 328 (V) aus dem Peak 7 des GC vom Grünen Afghan	39
17	NMR-Spektrum der Verbindung (V)	41
18	Massenspektrum des Hydrierungsproduktes der Verbindung (V)	45
19	Massenspektrum der Verbindung mit dem MG 308 (VI)	47
20	Massenspektrum der Verbindung mit dem MG 324 (VII)	49
21	Massenspektrum von Cannabielsoin -I	53
22	Massenspektrum des Dehydrocannabielsoin (IX)	53
23	Massenspektrum der Verbindung mit dem MG 310 (X) aus dem Peak 5	55
24	Massenspektrum der Verbindung mit dem MG 328 (XI) aus dem Peak 6	56
25	Massenspektrum der Verbindung mit dem MG 326 (XII) aus dem Peak 5	58
26	Massenspektrum des Cannabichromens (XIII)	62
27	Massenspektrum des Cannabidiols (CBD)	62
28	Massenspektrum des Diacetylderivates der Verbindung mit dem MG 312 (XIV)	64
29	Massenspektrum von Cannabivarol (XV)	65
30	Massenspektrum des Acetylderivates vom Tetrahydrocannabivarol (XVI)	66
31	Massenspektrum des Δ^{1}-THC	67
32	Massenspektrum des $\Delta^{1(6)}$-THC	67
33	Kapillargaschromatogramm des Haschisch-Tabak-Rauchkondensats	74
34	Massenspektrum des Dansyl- $\Delta^{1(6)}$-THC	80
35	Massenspektrum des Dansyl-CBN	80

THEORETISCHER TEIL

Einleitung

In den letzten Jahren ist in der Bundesrepublik der Mißbrauch von Rausch- und Betäubungsmitteln verschiedenster Art sprunghaft gestiegen. Eine besondere Rolle spielen dabei die vornehmlich aus den weiblichen Pflanzen des indischen Hanfs Cannabis sativa L., gewonnenen Präparate Marihuana und Haschisch.

Im internationalen Sprachgebrauch versteht man unter Marihuana (USA) oder Cannabis (Europa) die blühenden harzhaltigen Spitzen des Hanfs, während der Begriff Haschisch sich vorwiegend auf das rohe oder durch Kochen gereinigte Cannabisharz bezieht[1]. Die Farbe (hellbraun, rötlich bis schwarz) bildet in Verbindung mit dem Herkunftsland Handelsbezeichnungen, wie z. B. Heller Türke, Roter Libanese, Schwarzer Afghan.

Wer über Haschisch arbeitet, ist zunächst mit einer umfangreichen Literatur konfrontiert. Schon 1965 veröffentlichte eine Kommission der Vereinten Nationen eine Sammlung von über 1800 Literaturzitaten[2]. Die wichtigsten bis 1970 erschienenen Arbeiten über Cannabis wurden von Mechoulam[3] und Petrzilka[4] in Übersichtsartikeln zusammengefaßt. Eine ausführliche Abhandlung der Botanik und Chemie ist als Buch[5] erhältlich.

Im Vordergrund des Interesses standen die Isolation der Hauptkomponenten, damit verbundene Strukturaufklärungsprobleme, Nachweismöglichkeiten bei Mißbrauch und neuerdings pharmakologische Untersuchungen.

Problemstellung und Zielsetzung

Zu Beginn dieser Arbeit (1971) lagen einander widersprechende Berichte über das Auffinden nativer Cannabisinhaltstoffe insbesondere der Wirkkomponente Tetrahydrocannabinol (THC) im Urin von Haschischkonsumenten vor. Positive [6, 7, 8] und negative [9, 10] Befunde standen zur Diskussion.

Bei Tierversuchen wiesen Agurell und Nilson in vivo [13] und in vitro [14, 15] die Metabolisierung von THC zu hydroxylierten Verbindungen nach. Burstein [16] gelang dieser Nachweis im Urin erst nach vorangegangener Hydrolyse. Die gefundenen Metaboliten sind physiologisch aktiv [17], viele davon blieben unaufgeklärt.

Diese Befunde stützen die Theorie von Mechoulam , daß nicht die Isomeren des THC sondern ein Metabolit für die psychotrope Aktivität verantwortlich ist [3].

Weil es sich bei den ausgeschiedenen Cannabinoiden offenbar um außerordentlich kleine Mengen handelt, scheint mir eine allein auf chromatographische Methoden gestützte Beweisführung wie sie z. B. Pohl veröffentlicht [8] hat, sehr unsicher. Statt dessen sollte nach Aufarbeitung biologischen Untersuchungsmaterials eine Kombination Gaschromatographie-Massenspektrometrie zur Anwendung kommen, die schon bei der Lösung ähnlicher Probleme erfolgreich eingesetzt worden ist [11, 12].

Zur Beurteilung des Metabolismus und der psychogenen Wirkung nach Haschischgebrauch ist es notwendig, die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Haschischprobe zu kennen. Denn es ist fraglich, ob allein den THC-Isomeren eine aktive Wirkung zu-

kommt. So fand z. B. Philips[18], daß Marihuana aus Indiana (USA), der einen starken Rauschzustand erzeugen soll, nur einen geringen THC-Gehalt besitzt. Vermutlich sind die allgemein beobachteten unterschiedlichen Effekte nach Haschischgenuß auf Unterschiede in der Cannabinoidzusammensetzung zurückzuführen. Möglicherweise spielen dabei bisher nicht näher beschriebene Komponenten eine wesentliche Rolle. Die Existenz unbekannter Cannabinoide wird bei der Betrachtung der Gaschromatogramme von Haschischextrakten nahegelegt[34,42]. Die Identifizierung von Spurenverbindungen ist auch von Bedeutung, weil ihre Verteilung Hinweise auf die Herkunft, Lagerung und das Alter einer Probe gibt.

Die häufigste Art, Haschisch zu konsumieren besteht darin, es mit oder ohne Tabak vermischt zu rauchen. Miras[19] bemerkte schon 1964, daß ein Großteil des Harzes beim Rauchen verschwindet. Clausen und Korte[20] beobachteten ebenso wie Agurell und Leander[21], daß die z. T. als Phenolcarbonsäuren vorliegenden Inhaltsstoffe bei der thermischen Belastung decarboxylieren. Zur Klärung der Frage, ob infolge der Pyrolyse nicht auch Inhaltsstoffe von Cannabis in veränderter Form in den Stoffwechsel gelangen, schien es mir zweckmäßig, systematische Rauchversuche mit einer Abrauchmaschine durchzuführen. Das Kondensat sollte dann in der gleichen Weise wie natürliche Haschischextrakte auf seinen Cannabinoidgehalt untersucht werden.

Aus den oben dargelegten Gründen gliedert sich diese Arbeit in drei Abschnitte :

A. Isolation und Strukturaufklärung einiger neuer Cannabinoide aus Haschisch

B. Cannabinoide im Rauchkondensat nach dem Rauchen von Haschisch.

C. Zum Nachweis von Cannabinoiden im Urin und Speichel nach Haschischkonsum.

Neuere Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die während der Entstehung dieser Arbeit bis Januar 1974 publiziert wurden, sind in den Abschnitten A-C berücksichtigt.

A. Isolation und Strukturaufklärung einiger neuer Cannabinoide aus Haschisch

1. Bisherige Untersuchungsergebnisse

Haschisch ist ein komplexes Gemisch von bisher über 80 charakterisierten Verbindungen[22]. Zahlreiche Terpene[23], Sesquiterpene[24], Phenole[25-27], Zucker[25] und Alkaloide[28,29] wurden bisher aus C. sativa isoliert[27]. Verbindungen mit niederen Molekulargewichten (zwischen 136 und 222) wurden mit der Kombination Gaschromatographie-Massenspektrometrie nachgewiesen[30]. Das besondere Interesse galt einer Gruppe phenolartiger Verbindungen mit einundzwanzig C-Atomen. Für sie, ihre Homologen und Umwandlungsprodukte wurde der Name Cannabinoide vorgeschlagen[31].

Die Cannabinoid-Zusammensetzung von Haschisch verschiedener Herkunft schwankt sehr[22]. Als Hauptprodukte findet man jedoch immer wieder Cannabidiol (CBD), Tetrahydrocannabinol (THC) und Cannabinol (CBN). Die folgende Liste enthält alle Cannabinoide über deren Vorkommen in der bis Januar 1974 erschienenen Literatur referiert wurde.

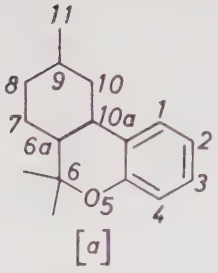
Die erste Spalte der Tabelle enthält die Strukturformeln, in der zweiten Spalte sind die Namen mit den üblichen Abkürzungen und in der dritten die Summenformeln mit dem Molekulargewicht (MG) als Zahlenangabe aufgeführt. Literaturzitate über die erstmalige Auffindung, Strukturaufklärung und ggf. Synthese sind in der letzten Spalte angegeben.

2. Zur Zählweise und Klassifizierung

Für die Nummerierung gibt es in der Literatur insgesamt vier Systeme [30]. Zwei davon werden bis heute gleichberechtigt angewandt.

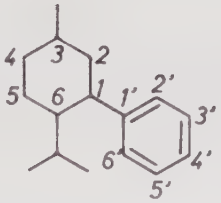
1. Die Dibenzopyrannummerierung (Korte)[32] (a) versagt in den Fällen, wo der Pyranring nicht geschlossen ist. Dann müssen die Derivate als substituierte Biphenyle (b) aufgefaßt werden.

2. Die Monoterpennummerierung (Mechoulam) [31] hat den Vorteil daß die C-Atome bei vielen Umwandlungen in der Cannabinoidreihe ihre Nummern behalten (c).



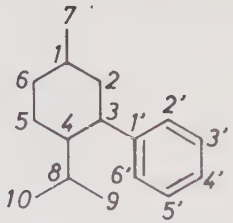
[a]

Dibenzopyran



[b]

Biphenyl



[c]

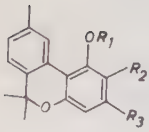
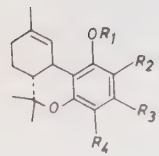
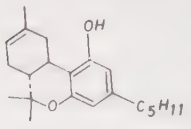
Monoterpen

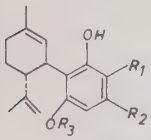
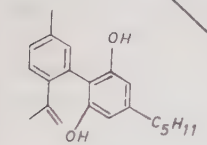
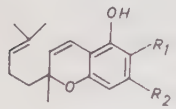
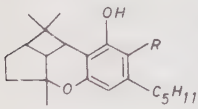
In dieser Arbeit wird die Monoterpennummerierung benutzt (c).

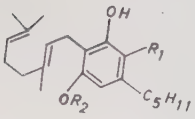
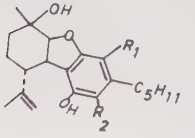
Wie aus der nachfolgenden Tabelle zu ersehen ist, haben die meisten Cannabinoide das gleiche Kohlenstoffgerüst. Sie unterscheiden sich voneinander wie folgt :

1. Substitution bei 4' durch Methyl, eine n-Propyl oder eine n-Pentyl-Seitenkette.
2. Auftreten einer Carboxylgruppe bei 3' oder 5'.
3. Ausbildung eines Pyran-oder Furanringes.
4. Sättigungsgrad des alicyclischen Ringes.

3. Tabelle der natürlichen Canabinoide (1973)

Struktur	Name	Abkürz.	Su. Formel	MG	Lit.
	Cannabiorcol $R_1 = R_2 = H$; $R_3 = CH_3$	C_1-CBN	$C_{17}H_{18}O_2$	254	33, 35)
	Cannabivarol $R_1 = R_2 = H$; $R_3 = C_3H_7$	C_3-CBN	$C_{19}H_{22}O_2$	282	35,37,41,42)
	Cannabinol $R_1 = R_2 = H$; $R_3 = C_5H_{11}$	CBN	$C_{21}H_{26}O_2$	310	45-47, 58)
	Cannabinolmethyläther $R_1 = CH_3$ $R_3 = C_5H_{11}$ $R_2 = H$		$C_{22}H_{28}O_2$	324	39)
	Cannabinolsäure $R_1 = H$; $R_2 = COOH$; $R_3 = C_5H_{11}$	CBNC	$C_{22}H_{26}O_4$	354	61)
	Δ^1-Tetrahydrocannabiorcol $R_1 = R_2 = R_4 = H$; $R_3 = CH_3$	C_1-THC	$C_{17}H_{22}O_2$	258	33, 35)
	Δ^1-Tetrahydrocannabivarol $R_1 = R_2 = R_4 = H$; $R_3 = C_3H_7$	C_3-THC	$C_{19}H_{26}O_2$	286	35,37,41,42) 91)
	Δ^1-Tetrahydrocannabinol $R_1 = R_2 = R_4 = H$; $R_3 = C_5H_{11}$	Δ^1-THC	$C_{21}H_{30}O_2$	314	51, 55)
	Δ^1-Tetrahydrocannabinolmethyläther $R_1 = CH_3$ $R_2 = R_4 = H$ $R_3 = C_5H_{11}$		$C_{22}H_{32}O_2$	328	39)
	Δ^1-Tetrahydrocannabinolsäure $R_1 = R_4 = H$ $R_3 = C_5H_{11}$ $R_2 = COOOH$	A	$C_{22}H_{30}O_4$	358	56, 57)
	Δ^1-Tetrahydrocannabinolsäure $R_1 = R_2 = H$ $R_3 = C_5H_{11}$ $R_4 = COOH$	B	$C_{22}H_{30}O_4$	358	44)
	$\Delta^{1(6)}$-Tetrahydrocannabinol $\Delta^{1(6)}$-THC		$C_{21}H_{30}O_2$	314	49,50)

Struktur	Name	Abkürz.	Su.-Formel	MG	Lit.
	Cannabidiorcol $R_1 = R_3 = H$; $R_2 = CH_3$	C_1-CBD	$C_{17}H_{22}O_2$	258	33, 35)
	Cannabidivarol $R_1 = R_3 = H$; $R_2 = C_3H_7$	C_3-CBD	$C_{19}H_{26}O_2$	286	35, 36, 41, 42)
	Cannabidiol $R_1 = R_3 = H$; $R_2 = C_5H_{11}$	CBD	$C_{21}H_{30}O_2$	314	48, 58)
	Cannabidiolmethyläther $R_1 = H$; $R_2 = C_5H_{11}$; $R_3 = CH_3$		$C_{22}H_{32}O_2$	328	39)
	Cannabidiolcarbonsäure $R_1 = COOH$; $R_2 = C_5H_{11}$; $R_3 = H$	CBDC	$C_{22}H_{30}O_4$	358	59-61)
	Cannabinodiol entspricht aromatisiertem CBD	CBND	$C_{21}H_{26}O_2$	310	43) Struktur fraglich vgl. diese Dissert. Seite : 31
	Cannabivarichromen $R_1 = H$; $R_2 = C_3H_7$	C_3-CBC	$C_{19}H_{26}O_2$	286	40, 41)
	Cannabichromen $R_1 = H$; $R_2 = C_5H_{11}$	CBC	$C_{21}H_{30}O_2$	314	52, 53)
	Cannabichromensäure $R_1 = COOH$; $R_2 = C_5H_{11}$	CBCC	$C_{22}H_{30}O_4$	358	65)
	Cannabicyclol $R = H$	CBL	$C_{21}H_{30}O_2$	314	Struktur fraglich vgl. 31) und 54) ferner : 66)
	Cannabicyclolsäure $R = COOH$	CBLC	$C_{22}H_{30}O_4$	358	Durch Lichteinwirkung aus Cannabichromen 40)

Struktur	Name	Abkürz.	Su.-Formel	MG	Lit.
	Cannabigerol $R_1 = R_2 = H$	CBG	$C_{21}H_{32}O_2$	316	62, 63)
	Cannabigerolsäure $R_1 = COOH$; $R_2 = H$	CBGC	$C_{22}H_{32}O_4$	360	61)
	Cannabigerolmethyläther $R_1 = H$; $R_2 = CH_3$		$C_{22}H_{34}O_2$	330	64)
	Cannabigerolsäuremethyläther $R_1 = COOH$; $R_2 = CH_3$		$C_{23}H_{34}O_4$	374	87, 88)
	Cannabielsoinsäure $R_1 = H$; $R_2 = COOH$	A	$C_{22}H_{30}O_5$	374	67, 86)
	Cannabielsoinsäure $R_1 = COOH$; $R_2 = H$	B	$C_{22}H_{30}O_5$	374	67, 86)

4. Chromatographische Übersichtsanalyse

Zur Untersuchung gelangten zwei beschlagnahmte Haschischproben unbekannter Herkunft. Dem Aussehen nach handelt es sich vermutlich um den Schwarzen und Grünen Afghan*). Für eine qualitative Analyse dieser Probe boten sich zwei Möglichkeiten an : die Dünnschichtchromatographie (DC) und die Gaschromatographie (GC), jeweils in Kombination mit einem Massenspektrometer (MS).

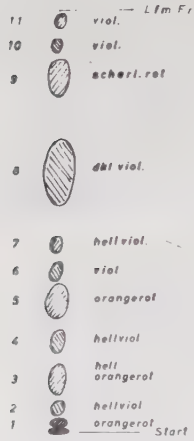
4.1 Dünnschichtchromatographie/Massenspektrometrie (DC/MS)

Ein häufig benutztes Verfahren der DC-Auftrennung von Haschischinhaltsstoffen wurde von Korte und Sieper [68] beschrieben. Bei dieser Methode wird der Petrolätherextrakt des Haschisch auf einer mit Dimethylformamid imprägnierten Kieselgelplatte und Cyclohexan als Fließmittel entwickelt. Der Nachweis der Hauptkomponenten (CBD, THC, CBN und CBDC) erfolgt durch Anfärben mit Echtblausalz B. Das Ergebnis dieser Verteilungschromatographie hängt stark vom Trockenheitsgrad des Imprägniermittels ab [69, 70] und somit von schlecht reproduzierbaren Bedingungen wie Raumtemperatur, Luftfeuchtigkeit und Trockenheit der imprägnierten Platten. Aus diesem Grund sind in der Literatur noch zahlreiche weitere Systeme vorgeschlagen, bei denen man jedoch hinsichtlich ihrer Trennleistung Kompromisse machen muß. Merkus [70, 71] und Paris [72] haben kürzlich die Vor- und Nachteile der bisher vorgeschlagenen Laufmittelsysteme eingehend diskutiert. Bei der DC-Trennung der Cyclohexan-Extrakte beider Haschischproben nach dem Verfahren von Korte und Sieper [68] erhielt ich ähnliche Chromatogramme.

---

*) Ich danke Herrn Dr. Gerd Döring vom Gerichtsmedizinischen Institut der Universität Göttingen für die Überlassung der Haschisch-

Die Abbildung 1 zeigt das DC des Schwarzen Afghan.



Zone 1 :	CBDC	(Cannabidiolsäure)
" 5 :	CBD	(Cannabidiol)
" 6 :	C_3-CBN	(Cannabivarol)
" 8 :	CBN	(Cannabinol)
" 9 :	Δ^1-THC	(Tetrahydrocannabinol) (vergl. Exp. Teil)

Abb. 1 : Dünnschichtchromatogramm des Cyclohexan-Extraktes vom Schwarzen Afghan. Verfahren nach Korte und Sieper[68].

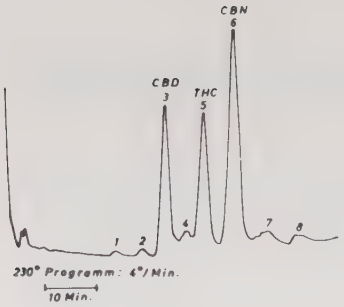
Die Zonen des nichtangesprühten Teils der Dünnschichtplatte wurden abgekratzt und die Verbindungen eluiert. Durch die Aufnahme von Massenspektren erfolgte dann die Korrelation der Zonen mit den einzelnen Komponenten. In den meisten Fällen wurden zunächst Gemische festgestellt. Die Reindarstellung der Hauptcannabinoide [CBD, THC und CBN] für Referenzzwecke gelang erst nach wiederholter Chromatographie und vor allem durch die Anwendung der präparativen Gaschromatographie.

4.2 Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)

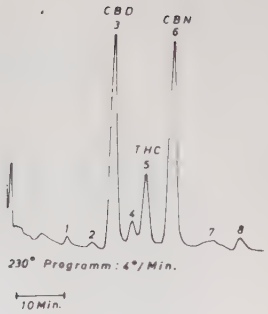
Die Methode der Wahl bei einer Analyse der Cannabisharzextrakte ist die Kombination Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS), denn die Proben können ohne Derivatisierung (z.B. Silylierung) direkt in die Säule injiziert werden. Als stationäre Phasen haben sich SE-30 [29, 73], OV-1 [72] und OV-17 [34] auf Chromosorb gleich gut bewährt. Diejenigen Cannabinoide, die als Carbonsäuren vorliegen, werden bei der notwendigen Säulentemperatur von über 200°C decarboxyliert. Somit wächst die Intensität der Peaks für die übrigen Cannabinoide um den Betrag an, der den decarboxylierten Verbindungen entspricht. Die Kombination mit einem Massenspektrometer ist für eine Haschischanalyse besonders vorteilhaft, weil man von Cannabinoiden Massenspektren mit intensiven Molekülionen und eine Anzahl Schlüsselionen zur Strukturaufklärung [74, 74] erhält.

Bei der GC-Trennung der Cyclohexan- und Methanolextrakte der Haschischproben erhielten wir die folgenden Gaschromatogramme (Abb. 2).

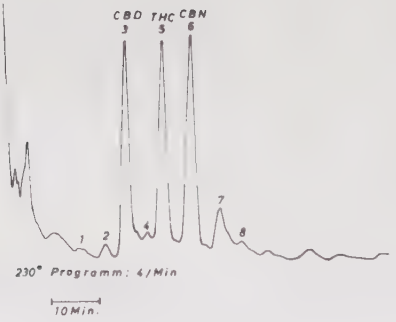
Neben den Hauptkomponenten CBD, THC und CBN traten in den Gaschromatogrammen noch kleinere Peaks auf; so z.B. der Peak 4 zwischen dem CBD und dem THC-Peak und der Peak 7, der Verbindungen anzeigt, die erst nach dem CBN von der Säule eluiert werden. Sie entsprechen offenbar bisher noch unbekannten Cannabisbestandteilen.



(a)



(b)



(c)

Abb. 2 : Gaschromatogramme der Cyclohexan-Extrakte vom GrünenAfghan (a) und Schwarzen Afghan (b). Das Chromatogramm (c) erhält man nach Methanolextraktioneines bereits mit Cyclohexan ausgezogenen Grünen Afghanen . (Vergl. (a))

3% OV-17 auf Chromosorb G, AW-DMCS; 80/100 mesh, 1,5 m Glassäule, Innendurchmesser 2mm.

Das Massenspektrum des Peak 4, (Abb. 3) zeigt ein Gemisch mehrerer Verbindungen der Molekulargewichte 342, 332, 328 und 326. Da Verbindungen dieser Molekulargewichte der Haschischbestandteile noch unbekannt waren, wurde versucht, durch präparative

Gaschromatographie eine zur Strukturaufklärung ausreichende Probenmenge zu sammeln. Gleichzeitig fingen wir auch die in den übrigen Peaks enthaltenen Stoffe in Kapillarröhrchen auf. Massenspektren dieser Fraktionen zeigten, daß alle diese Peaks neben den bekannten Verbindungen noch weitere Cannabinoide enthielten.

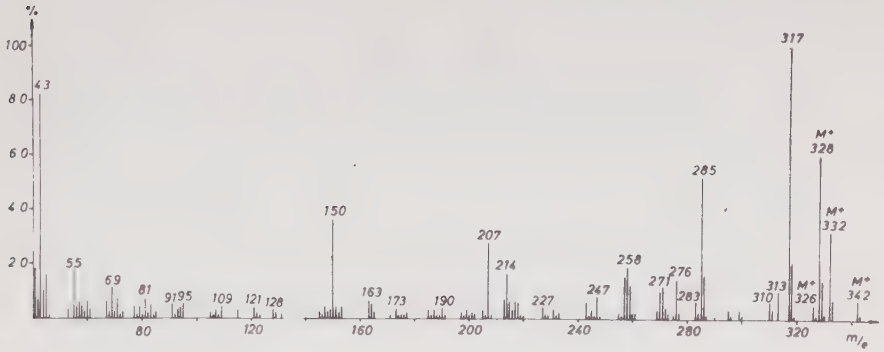


Abb. 3 : Massenspektrum des Peaks 4 vom Gaschromatogramm des Cyclohexan-Extraktes vom Grünen Afghan [Abb. 2 (a)].

4.3 Kapillargaschromatographische Trennung von Cannabinoiden

Eine vollständige Trennung von Haschischproben ist wie gezeigt wurde weder mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie noch mit der normalen gaschromatographischen Säule möglich. Damit ist auch eine quantitative Bestimmung (z. B. des als aktive Komponente betrachteten THC [84]) mit diesen Methoden undurchführbar. Diese Feststellung wird am besten durch ein Gaschromatogramm des gleichen Cannabisextraktes wie in 2 (a) untermauert, das mit einer Glaskapillarsäule aufgenommen wurde. Wie die Abb. 4 zeigt,

erreicht man mit einer solchen Säule eine viel höhere Trennleistung.

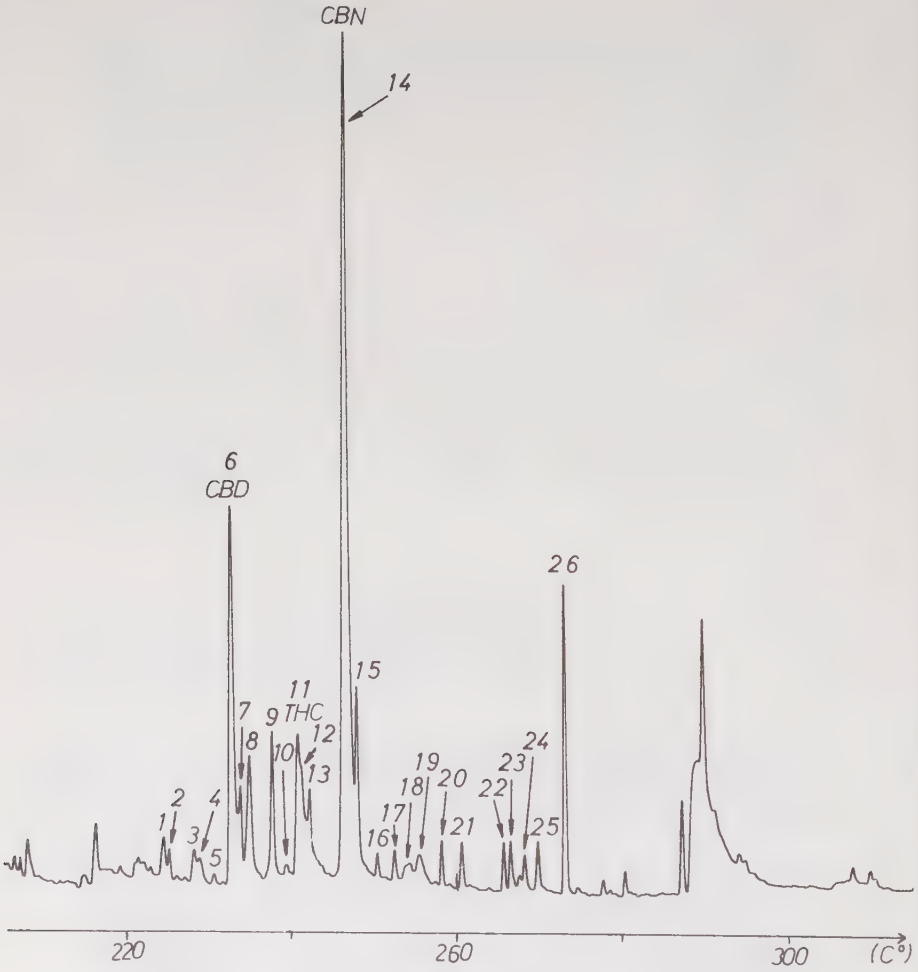


Abb. 4 : Kapillar-GC des Cyclohexan.-Extraktes vom Grünen Afghan (Bedingungen im Exp. Teil)

Peak 3 =	C_1CBD	Peak 11 =	Δ^1 - THC
" 5 =	C_3-CBN	" 13 =	MG 308 (VI)
" 6 =	CBD	" 14 =	CBN und MG 328 (XI)
" 7 =	MG 332 (II)	" 17 =	MG 328 (V)
" 8 =	MG 328 (I) und MG 326 (IV)	" 19 =	MG 310 (III)
		" 21 =	MG 340 (XVII)
" 9 =	Cannabielsoin I (VIII)	" 26 =	kein typischer Hasch. Inhaltsstoff (vergl. S. 73)
" 10 =	$\Delta^{1(6)}$-THC		

Beispielsweise wird der THC-Peak in mehrere Komponenten aufgespalten, die in vergleichbarer Menge vorhanden sind (Peaks 9-13). Die übliche gaschromatographische Bestimmung des THC-Gehalts im Haschisch täuscht demnach einen viel höheren Wert vor, als dies tatsächlich der Fall ist. Leider ist die Glaskapillar-Gaschromatographie nicht geeignet, um die einzelnen Komponenten in einer für mikropräparative Arbeiten und spektroskopische Untersuchungen ausreichenden Menge zu sammeln. Ich war daher gezwungen, durch Schneiden der GC-Peaks einer normalen Säule die Einzelbestandteile anzureichern (Kontrolle durch Aufnahme von MS) und anschließend die gesammelten GC-Fraktionen auf DC-Platten weiter aufzutrennen. Die auf solche Weise erhaltenen reinen Verbindungen wurden zur Strukturbestimmung verwendet und dienten auch als Referenzsubstanzen für die nachträgliche Zuordnung *) der Peaks im Kapillargaschromatogramm der Abb. 4.

---

*) Dieses umständliche Verfahren war notwendig, weil eine Kopplung Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie in unserem Labor noch nicht zufriedenstellend gelöst ist.

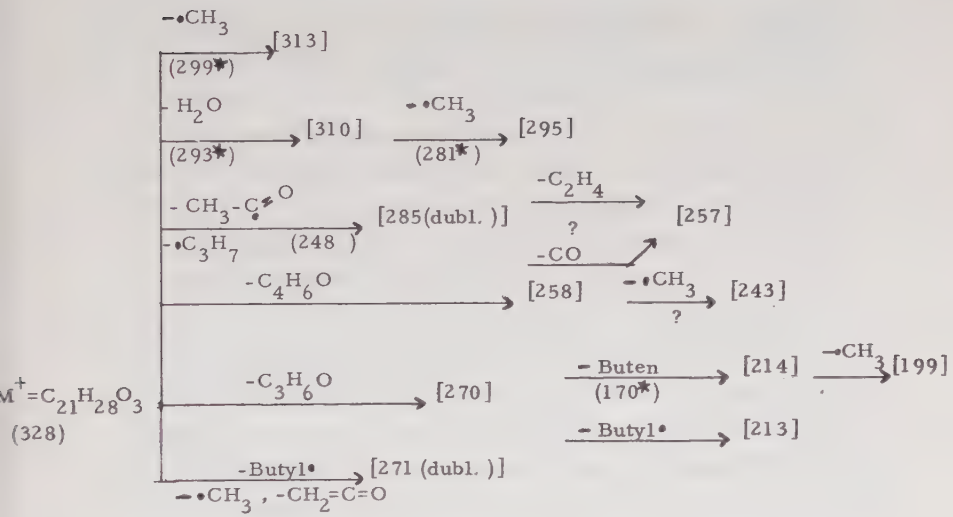
5. Die Verbindung mit dem MG 328 (I) aus dem Peak 4

Aus dem Gemisch der zwischen dem Peak des CBD und dem THC liegenden Cannabinoidfraktion (Peak 4 im GC Abb. 2a) konnte durch Dünschichtchromatographie (Kieselgel/Benzol) die Verbindung mit dem Molekulargewicht (MG)328 in reiner, aber öliger Form erhalten werden.

Die Summenformel wurde durch hochauflösende Massenspektrometrie zu $C_{21}H_{28}O_3$ bestimmt. Sie entspricht formal einem THC, das 2 Wasserstoff-Atome verloren hat und dafür 1 Sauerstoffatom mehr besitzt. Das Massenspektrum (Abb. 5) zeigte ein intensives Schlüsselion der Masse 285 das dem Verlust von $CH_3CO\cdot$ sowie $C_3H_7\cdot$ im Verhältnis 3:1 entspricht. Die Abspaltung von $C_3H_7\cdot$ ist eine für Monoterpene [76, 77] und Cannabinoide [75] typische Zerfallsreaktion.

Das Vorhandensein einer n-Pentylseitenkette wird wahrscheinlich gemacht durch das Auftreten eines Ions der Masse 271 ($C_{17}H_{19}O_3$) entsprechend der Abspaltung von $C_4H_9\cdot$ sowie von Ionen der Masse 214 ($C_{14}H_{14}O_2$) und 213 ($C_{14}H_{13}O_2$), die durch Abspaltung von Buten bzw. eines Butylradikals aus dem Ion der Masse 270 entstehen. Letzteres verdankt seine Herkunft der Abspaltung von C_3H_6O aus dem Molekülion.

5.1 Fragmentierungsschema der Verbindung (I)



Die Zahlen haben die Dimension [m/e] und geben Auskunft über die Entstehung der Ionen. Zur Hochauflösung, vergl. Exp.-Teil.

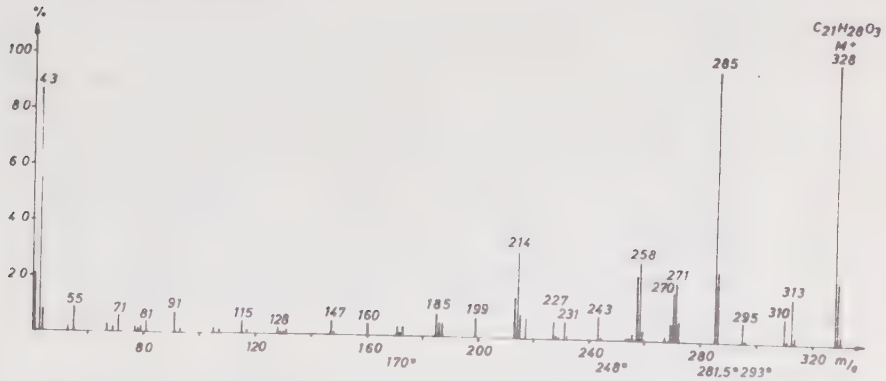


Abb. 5 : Massenspektrum der Verbindung mit dem MG 328 (I) aus Peak 4 des GC vom Grünen Afghan (Abb. 2a)

5.2 Weitere spektroskopische Befunde der Verbindung (I)

Die aus dem MS abgeleitete Anwesenheit einer C_5-Seitenkette wird durch das Kernresonanzspektrum [x] (Abb. 6a) gestützt.

Das Auftreten eines Tripletts bei δ = 0,9 ppm [xx] (J = 6 Hz) und eines Multipletts bei δ = 1,32 ppm zeigt die Gegenwart einer aliphatischen Methylgruppe und aliphatischer Methylengruppen an. Ein weiteres Triplett bei δ = 2,60 ppm (J = 6 Hz), dessen Integral nur zwei Protonen umfaßt, ist einer benzylischen Methylengruppe zuzuordnen. Das drei Protonen entsprechende Singulett bei δ = 1,63 ppm weist auf eine an einer Doppelbindung stehende Methylgruppe hin. Am zweiten Kohlenstoffatom dieser Doppelbindung ist ein Proton gebunden, dessen Signal bei δ = 6,39 ppm auftritt. Beim Einstrahlen dieser Frequenz tritt es in Resonanz mit dem Singulett der olefinischen Methylgruppe (δ = 1,63 ppm). Somit trägt die Verbindung das Strukturelement $CH_3-\overset{|}{C}=CH-$.

Das Dublett bei δ = 2,41 ppm (J = 6 Hz) deutet auf eine allylische Ringmethylengruppe hin. Zwei jeweils drei Protonen entsprechende Singuletts bei δ = 1,90 ppm und δ = 1,98 ppm sprechen für das Auftreten einer zu tieferem Feld verschobenen geminalen Methylgruppe.

Die beiden metaständigen aromatischen Protonen (bei δ = 7,08 ppm und δ = 6,74 ppm) legen nahe, daß die Verbindung ein zum THC analoges aromatisches Ringsystem besitzt. Das Fehlen eines Signals im Bereich von δ = 4 bis 5 ppm für eine endständige Methylengruppe zeigt, daß die Verbindung keine Isopropenylgruppe trägt wie z. B. das CBD (Abb. 6c).

---

[x] Die Zuordnung der NMR-Signale wurde durch Vergleich mit den bisher für Cannabinoide veröffentlichten NMR-Daten [31] bzw. durch Aufnahme von Vergleichsspektren des Δ^1-THC (Abb. 6b) und des CBD (Abb. 6c) erleichtert.

[xx] Die chemischen Verschiebungen sind in ppm von TMS angegeben; Lösungsmittel : Tetrachlorkohlenstoff.

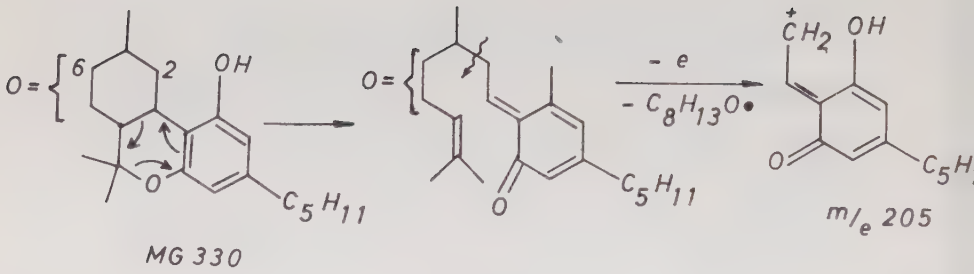
Aus dem IR-Spektrum (KBr) läßt sich die Gegenwart einer phenolischen Hydroxylgruppe (3390 cm^{-1}) und einer Carbonylgruppe (1705 cm^{-1}) erkennen. Um ein α, β ungesättigtes Ringketon handelt es sich offenbar nicht, denn dann wäre eine Bande bei niederer Wellenzahl (etwa 1675 cm^{-1}) zu erwarten [78, 79]. Auch das UV-Spektrum stützt diesen Befund, weil eine Absorption bei 230 nm nicht zu beobachten ist.

5.3 Derivatisierung von (I)

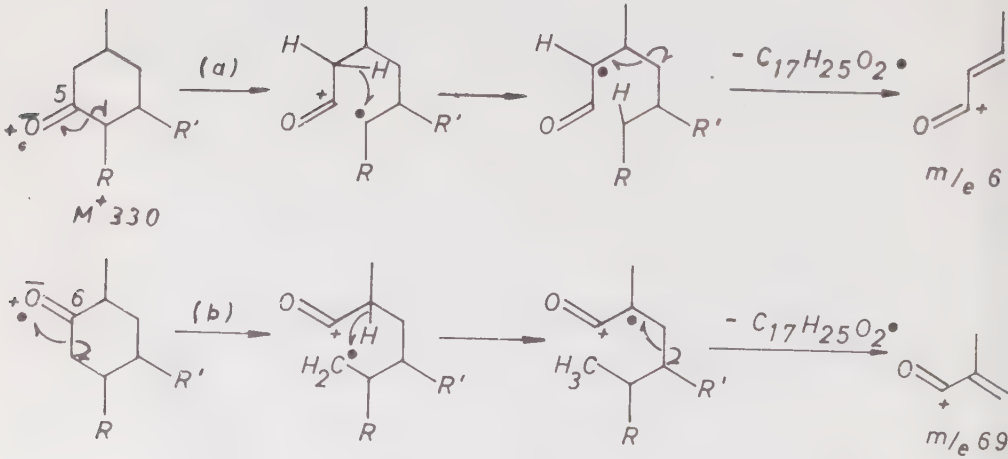
Zur weiteren Aufklärung wurden Mikroproben der Verbindung (0,2 mg) trimethyl silyliert und acetyliert.

Das Massenspektrum des TMS-Derivates zeigt ein Molekülion bei der Masse 400 (= 328 + 72 ME), so daß die Verbindung nur eine silylierbare Hydroxylgruppe enthalten kann. Ihr phenolischer Charakter wird durch das Massenspektrum des Monoacetates (Abb. 7) dokumentiert. In der für Phenolacetate typischen Weise [80] verliert das Molekülion (M^+ = 370) Keten (42 ME) und zerfällt dann wie das freie Phenol (Abb. 5).

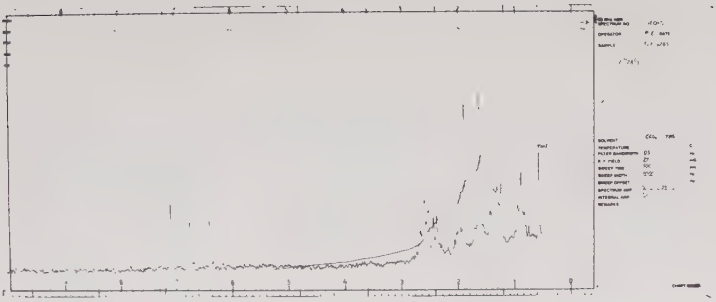
Bei der Hydrierung mit $Pd/CaCO_3$ wurden nach Aussage des Massenspektrums (Abb. 8) zwei Wasserstoffatome aufgenommen. Weiterhin zeigt das Massenspektrum zwei Bruchstücke, die für eine Strukturableitung von besonderer Bedeutung sind. Das Schlüsselion Der Masse 205 entspricht dem Verlust von $C_8H_{13}O\cdot$. Unter der Annahme, daß die Verbindung das gleiche Ringskelett wie das THC besitzt – wobei eine Methylengruppe zur Carbonylgruppe aufoxidiert wurde – entspräche das der folgenden durch einen Dienzerfall eingeleiteten Abbaureaktion :



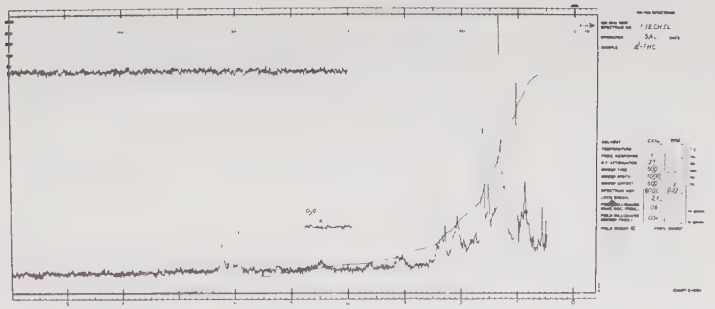
Die Bildung des Ion der Masse 69 ($C_4H_5O^+$) ist ebenfalls nur zu verstehen, wenn die Carbonylgruppe in der Position 5 (Weg a) oder 6 (Weg b) lokalisiert ist :



(a)



(b)



(c)

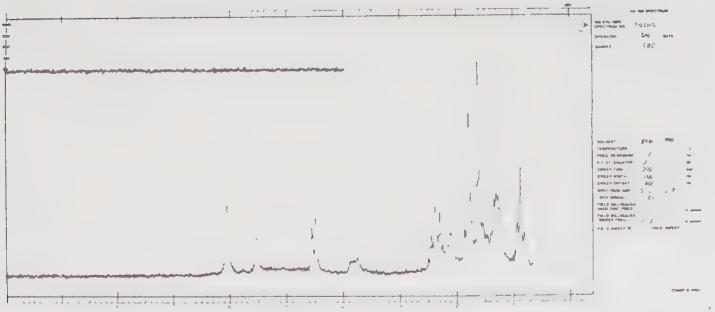


Abb. 6 : NMR-Spektrum der Verbindung mit dem MG 328 (I) (a) und zum Vergleich die Spektren von Δ^1-THC (b) und CBD (c) aufgenommen in CCl_4 .

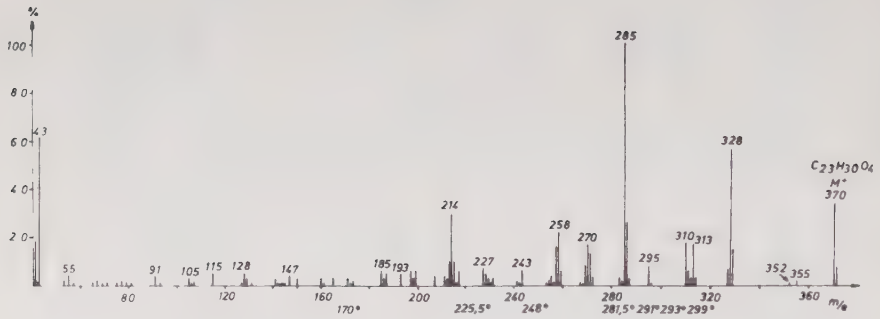


Abb. 7 : Massenspektrum des Acetylierungsproduktes der Verbindung mit dem MG 328 (I)

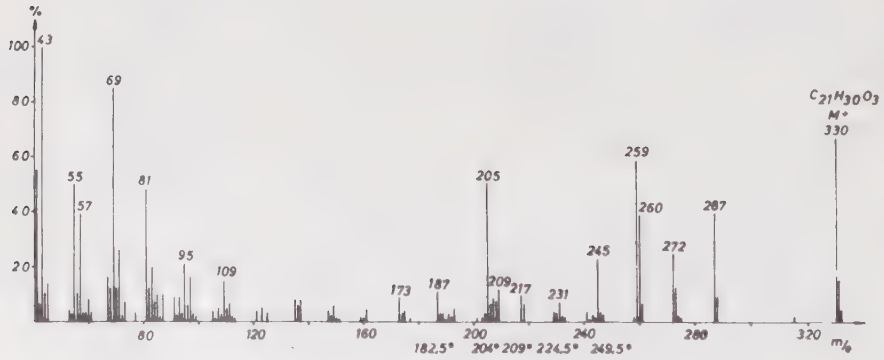
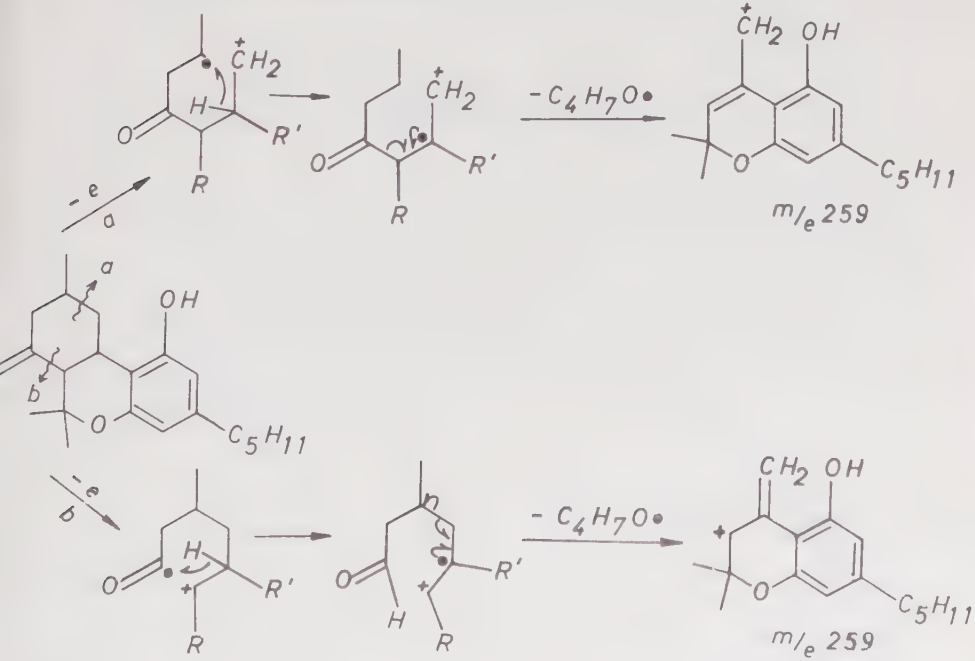
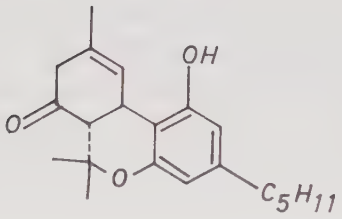


Abb. 8 : Massenspektrum des Hydrierungsproduktes der Verbindung mit dem MG 328 (I)

Nachdem die relative Lage der Doppelbindung und der Methylgruppe zueinander durch das NMR-Spektrum festgelegt ist, und das IR- und UV-Spektrum eine α,ß-ungesättigte Carbonylverbindung ausschließen, ist für die Carbonylgruppe die Position am Kohlenstoffatom fünf wahrscheinlich gemacht. Diese Nachbarschaft der Carbonylgruppe könnte auch die Ursache für die im NMR beobachtete Verschiebung der geminalen Methylgruppen zu tieferem Feld sein (vergl. Abb. 6a und 6b), denn am Dreidingmodell kann gezeigt werden, daß eine Carbonylgruppe in dieser Stellung einen Anisotropieeffekt auf die benachbarten Methylgruppen ausübt. In Übereinstimmung mit der postulierten Struktur (I) steht auch das Auftreten des Ions der Masse 259 im Dihydroderivat, das den Verlust von $C_4H_7O\cdot$ anzeigt und dessen Entstehung auf folgendem Wege zu deuten ist :



Aus den Untersuchungsbefunden lassen sich keine Aussagen über die Stereochemie ableiten, jedoch wurde die Formel (I) unter der Annahme gleicher Stereochemie wie bisher bei Cannabinoiden angegeben.



(I) 5-Oxo- Δ^1-tetrahydrocannabinol

6. Die Verbindung mit dem MG 332 (II)

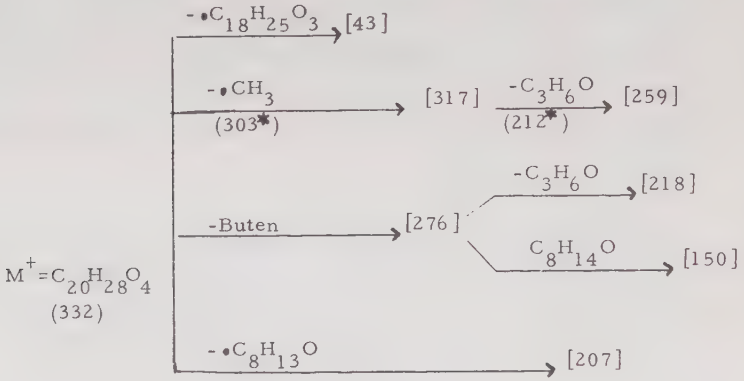
Als zweite Komponente konnte aus dem Peak 4 (GC Abb. 2a) die Verbindung mit dem Molekulargewicht 332 (II) in reiner Form gewonnen werden. Im Gegensatz zu den bisher bekannten Cannabinoiden mit 21 Kohlenstoffatomen, hat diese Verbindung die Summenformel $C_{20}H_{28}O_4$.

Das Massenspektrum (Abb. 9) zeigt, daß die Abspaltung einer Methylgruppe stark begünstigt ist (m/e 317 = Basispeak). Das Vorhandensein einer an einen Aromaten gebundenen n-Pentylseitenkette wird durch das Auftreten eines Ions der Masse 276 ($C_{16}H_{20}O_4$) wahrscheinlich gemacht. Dieses Ion wird unter Abspaltung von C_3H_6O zu einem Bruchstück der Masse 218 abgebaut.

Das Fragment der Masse 259 verdankt seine Entstehung ebenfalls der Abspaltung von C_3H_6O aus dem M-15 Bruchstück.

Von besonderer struktureller Bedeutung sind die Ionen m/e 207 und m/e 150. Das Ion der Masse 150 entsteht aus dem Spaltstück der Masse 276 durch Verlust von $C_8H_{14}O$, das der Masse 207 direkt aus dem Molekülion durch Verlust von $\cdot C_8H_{13}O$. Offensichtlich unterscheiden sich die beiden Spaltreaktionen voneinander nur durch die zusätzliche Verschiebung eines Wasserstoffatoms (vergl. Fragmentierungsschema 6.1).

6.1 Fragmentierungsschema der Verbindung (II)



Zur Hochauflösung, vergl. Exp. Teil

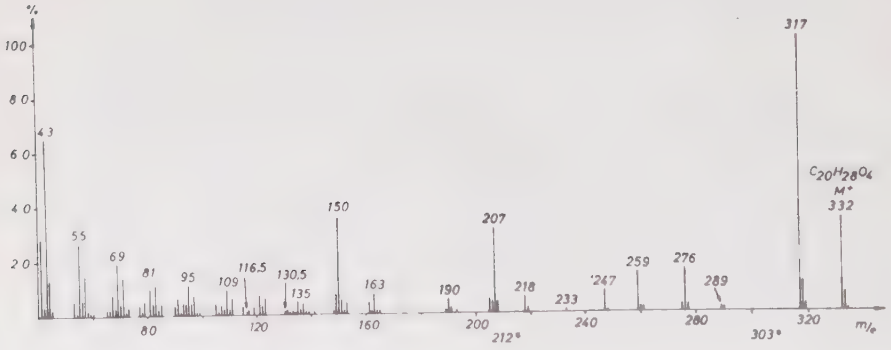


Abb. 9: Massenspektrum der Verbindung mit dem MG 332 (II) aus Peak 4 des GC vom Grünen Afghan (Abb. 2a)

6.2 Derivatisierungen von (II)

Um tieferen Einblick in die Spaltreaktionen zu bekommen, wurde die Ausgangsverbindung hydriert, acetyliert und methyliert.

Bei dem Hydrierungsversuch mit $Pd/CaCO_3$ änderte sich das Molekulargewicht nicht. Somit enthält (II) keine hydrierbare Doppelbindung.

Durch die Umsetzung von (II) mit Acetanhydrid/Pyridin wurde ein Monoacetylderivat erhalten (M^+ = 374). Offenbar ist die Reaktion erschwert, denn es wurde eine Ausbeute von nur 30% erzielt (GC/MS Kontrolle).

Nach der Methylierung der Ausgangsverbindung zeigte das Massenspektrum des Reaktionsproduktes ein um vierzehn Masseneinheiten höheres Molekulargewicht. (MS, Abb. 10). Demnach konnte die Verbindung (II) auch nur eine phenolische Hydroxylgruppe enthalten.

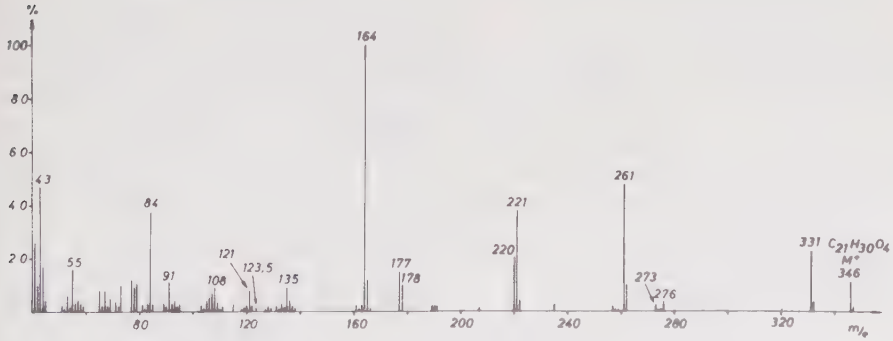
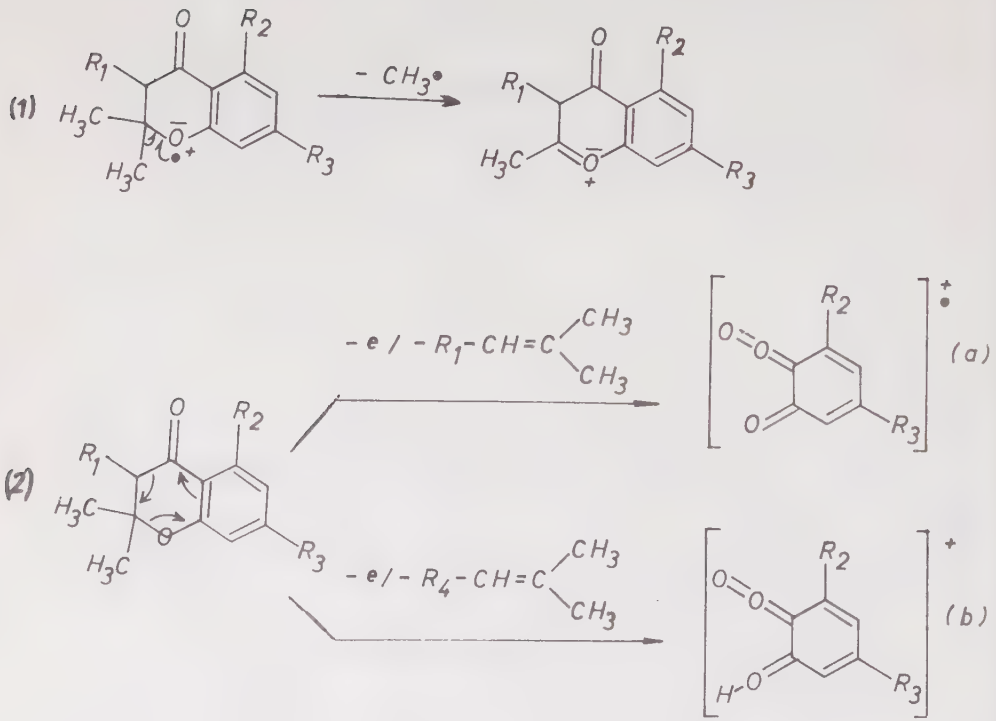


Abb. 10 : Massenspektrum des Methyläthers von (II)

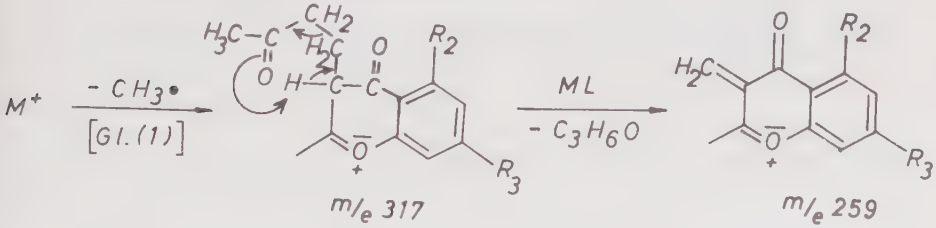
Aus der Verschiebung der drei Sauerstoffatome enthaltenden Schlüsselbruchstücke der Massen 150, 207, 259 und 276 um jeweils 14 ME gegenüber der Ausgangsverbindung (II), läßt sich ableiten, daß diese Spaltstücke zum aromatischen Teil des Moleküls gehören. Nimmt man für diesen aus biogenetischen Gründen eine sich vom Olivetol ableitende Struktur an, so müssen diese Spaltstücke außer dem aromatischen Ring noch eine Carbonylgruppe tragen. Aus der Literatur sind die Massenspektren von Methyl-Chroman-4-one [81] und ähnlichen Verbindungen [82, 83] bekannt. Für solche Verbindungen sind folgende Abbaureaktionen typisch :



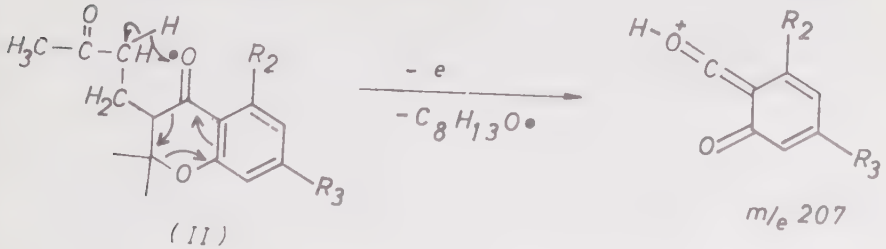
R_4 = R_2 minus 1 H-Atom

Falls sich im Rest R_1 ein aktives Wasserstoffatom befindet, kann die Abbaureaktion (2) auch von der Verschiebung dieses Wasserstoffatoms begleitet sein[83], so daß ein Bruchstück auftritt, das um eine Masseneinheit schwerer ist (Ion b).

Auf die hier untersuchte Verbindung übertragen, läßt sich die Bildung der Spaltstücke folgendermaßen deuten: die Entstehung des Ions m/e 317 wird mit Gl. (1) beschrieben. Die Fragmente m/e 150 (aus m/e 276) und m/e 207 (aus dem Molekülion) werden nach dem in Gl. (2) gegebenen Mechanismus gebildet. Die Struktur des Restes $R_1 = C_4H_7O$ ergibt sich aus dem Auftreten eines Schlüsselbruchstückes der Masse 43 und den Spaltreaktionen, die unter Verlust von C_3H_6O verlaufen (vergl. Fragmentierungsschema). Das Ion der Masse 43 (C_2H_3O) deutet auf das Vorhandensein einer Acetylgruppe hin und die Acetonabspaltung zeigt, daß es sich hierbei um eine endständige Acetylgruppe an einer aliphatischen Seitenkette handelt, die im Zuge einer McLafferty-Umlagerung abbaubar ist :

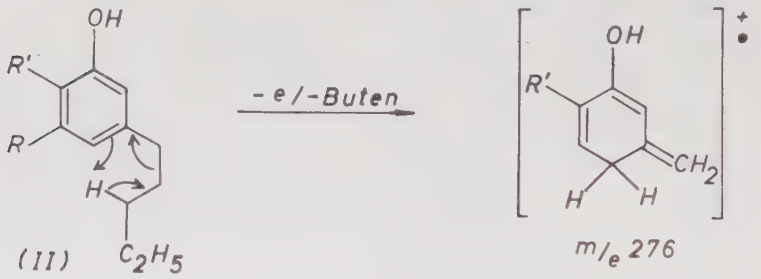


Somit kann auch die unter Wasserstoffverschiebung verlaufende Bildung des Ion m/e 207 plausibel gemacht werden (siehe auch Gl. 2b).

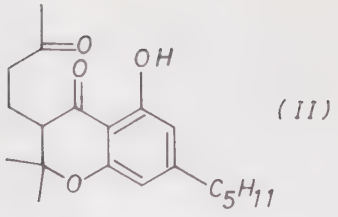


Der Rest R_2 ist eine phenolische Hydroxylgruppe (Bildung eines Monoacetates, bzw. Monomethyläthers), deren geringe Bereitschaft zur Acetylierung auf die sterische Hinderung der benachbarten Carbonylgruppe zurückzuführen ist.

R_3 ist die n-Pentylseitenkette, die ebenfalls durch eine McLafferty-Umlagerung abgebaut wird.



Damit ergibt sich für das Molekül mit dem MG 332 die Struktur (II).



(II)

2,2-Dimethyl-5-hydroxy-3-(3-oxo-butyl)-7-pentyl-4-chromanon

7. Die Verbindung mit dem MG 310 (III) aus dem Peak 7

Aus dem Peak 7 der Gaschromatogramme vom Cyclohexan-Extrakt des Grünen und Schwarzen Afghanen (Abb. 2a und 2b) konnte durch Dünnschichtchromatographie eine Verbindung mit dem MG 310 (III) isoliert werden.

Nach der Summenformel $C_{21}H_{26}O_2$ ist sie isomer zum CBN. Die Massenspektren des CBN (Abb. 11) und der neuen Verbindung (III) (Abb. 12) sind ähnlich bruchstückarm. Während beim CBN die für geminale Dimethylchromensysteme typische Abspaltung eines Methylradikals dominiert [75] (m/e 295=Basispeak), ist das Molekülion (III) stabiler (M^+ = Basispeak).

Ein weiterer auffallender Unterschied besteht in der bei (III) bevorzugten Abspaltung des Radikals $\cdot C_3H_7$ einmal vom Molekülion (⟶ m/e 267) und zum anderen vom Ion m/e 254 (⟶ m/e 211). Die auf diese Weise entstandenen Ionen haben zwar nur eine relative Intensität von 5%, jedoch sind sie in (III) vorhanden, während sie im Spektrum des CBN völlig fehlen.

Die Eliminierung einer n-Pentylseitenkette erfolgt bei (III) in der für höhere Alkylbenzole üblichen Weise durch Verlust von C_4H_8 (⟶ m/e 254) (s. S. 30). Das durch Abspaltung eines Butylradikals aus dem Molekülion von (III) entstandene Teilchen m/e 253 kann – wie ein metastabiler Peak bei m/e 224* beweist – noch ein Methylradikal (⟶ m/e 238) verlieren. Das entsprechende Ion beim CBN hingegen verdankt seine Entstehung der Abspaltung dieser zwei Radikale in umgekehrter Reihenfolge [75].

Peaks bei halben Massenzahlen (m/e 112,5 ; m/e 119,5 und m/e 155,5) sind ein Hinweis dafür, daß ein aromatisches System vorliegt.

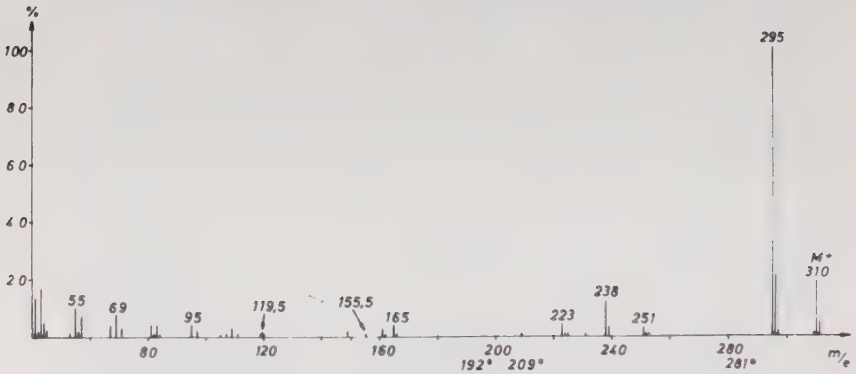


Abb. 11 : Massenspektrum des CBN

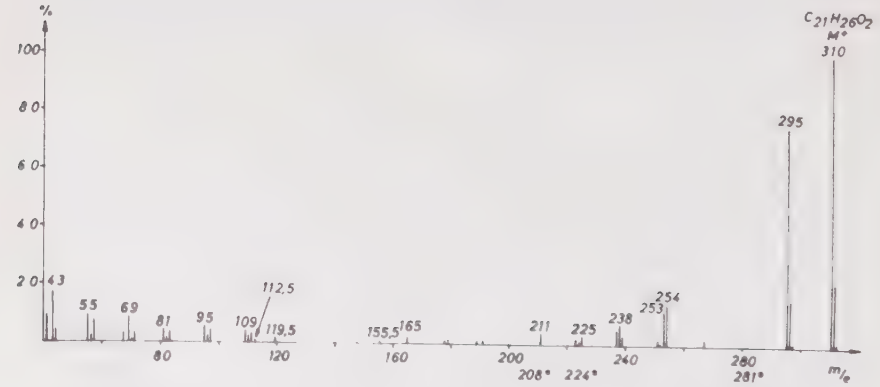
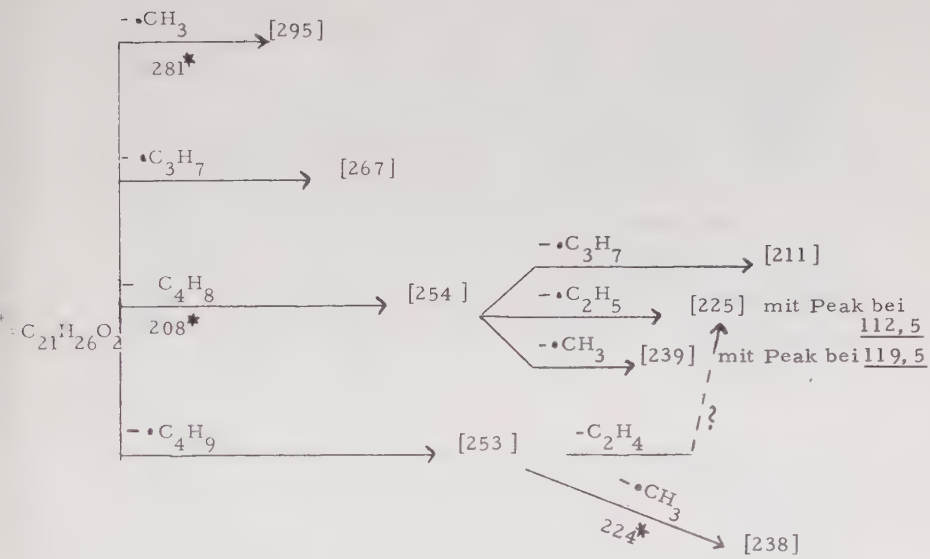


Abb. 12 : Massenspektrum der Verbindung mit dem MG 310 (III) aus dem Peak 7

7.1 Fragmentierungsschema der Verbindung (III)



7.2 Derivatisierung der Verbindung (III)

Aufgrund der massenspektrometrischen Befunde und des Austritts aus der GC-Säule lag der Verdacht nahe, daß es sich bei der Verbindung (III) um das erst kürzlich von Vree und Mitarb. [43] beschriebene Cannabinodiol (CBND), einem aromatischen Cannabidiol (s. Tab. S. 7) handelt. Die Strukturermittlung erfolgte mit Hilfe einer Kurvenschar, die erhalten wurde, nachdem die relativen Intensitäten der Ionenströme m/e 310 und m/e 295 bei der Elektronenenergie 12, 14, 16, 18 und 20 eV gemessen wurde (mass-intensity-graph).

Aufschluß darüber, ob (III) die für CBND angegebene Struktur hat, erhofften wir durch Derivatisierung zu erhalten. Handelt es sich bei unserer Verbindung (III) um CBND, so müssen sich bei Umsetzung mit Acetanhydrid/Pyridin bzw. bei einer Trimethylsilylierung 2 Gruppen einführen lassen. Mir gelang jedoch in beiden Fällen nur die Einführung einer Gruppe. [Monoacetat (M^+ 352 = 310 + 42 ME) und Mono-TMS-äther (M^+ 382 = 310 + 72 ME)]. Um sicher zu gehen, wurden in einem Parallelversuch als Modellverbindung für CBND zwei Proben CBD umgesetzt, wobei wir erwartungsgemäß das Diacetat (M^+ 396 = 314 +2 x 42 ME) und den Bistrimethylsilyläther (M^+ 458 = 324 + 2 x 72 ME) erhielten. Demnach kann die Verbindung (III) nur eine phenolische Gruppe enthalten.

7.3 Das Kernresonanzspektrum der Verbindung (III)

Endgültige Klarheit über die Struktur von (III) wurde durch Aufnahme eines NMR-Spektrums erhalten. Das in der Abb. 13 gezeigte Spektrum hat ein scharfes Dublett bei δ = 1,31 ppm (J = 6,5 Hz) das zwei Methylgruppen zuzuordnen ist. Bei δ = 4,32 ppm (J = 6,5 Hz) tritt ein Proton als Septett auf. Strahlt man die Energie für das Signal bei δ = 4,32 ppm ein, dann fällt das Dublett für die zwei Methylgruppen zusammen. Somit sind diese sieben Protonen als Bestandteil einer Isopropylgruppe festgelegt. Ein Signal , das für die Isopropylidenstruktur des CBND bei δ = 4,5 ppm zu erwarten wäre, fehlt (vergl. NMR des CBD in Abb. 6c).

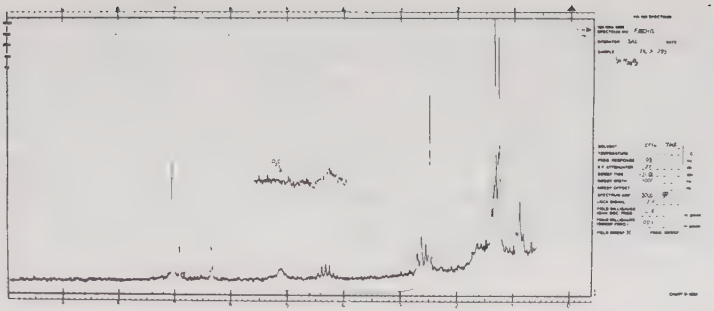


Abb. 13 : NMR-Spektrum der Verbindung mit dem MG 310 (III)

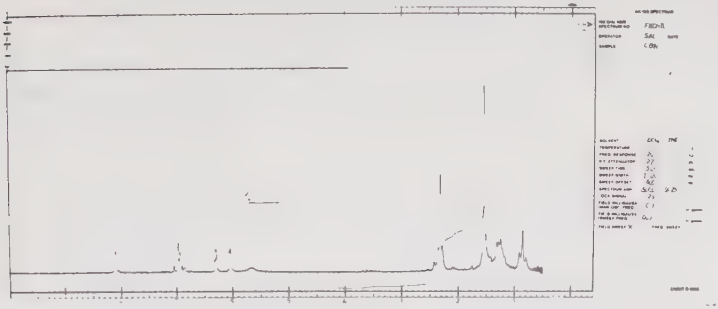
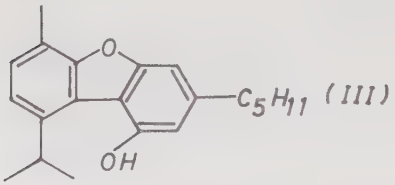


Abb. 14 : NMR-Spektrum des CBN

Die übliche C_5 Seitenkette ist angezeigt durch ein Triplett bei $\delta = 0,9$ ppm ($J = 6$ Hz) für die endständige Methylgruppe, ein Multiplett bei $\delta = 1,6$ ppm für aliphatische Methylene, sowie ein Triplett bei $\delta = 2,63$ ppm ($J = 7$ Hz) für zwei benzylische Protonen.

Eine Methylgruppe ist an den Aromaten gebunden (Signal bei $\delta = 2,49$ ppm) und zwei metaständige Protonen erscheinen bei $\delta = 6,34$ ppm und $\delta = 6,91$ ppm. Außerdem tritt ein scharfes Singulett für zwei gleichwertige aromatische Protonen (orthoständig) bei $\delta = 7,04$ ppm auf.

Da nur eine phenolische Gruppe vorhanden ist und ein Signal für den aromatischen Wasserstoff am C-2-Atom fehlt (beim CBN erscheint es bei $\delta = 8,2$ ppm, vergl. Abb. 14), ergibt sich für die Verbindung (III) eine Dibenzofuran-Struktur. Die von Vree dem CBND zugeteilte Struktur erscheint daher fraglich. Eine Klärung kann jedoch erst bei Vorliegen entsprechenden Vergleichsmaterials herbeigeführt werden.



1-Hydroxy-9-isopropyl-6-methyl-3-pentyl-dibenzofuran

8. Verbindung mit dem MG 326 (IV) aus dem Peak 4

In kleiner Menge enthält der Peak 4 der Gaschromatogramme (Abb. 2a u. 2b) eine Verbindung mit dem Molekulargewicht 326 und der Bruttoformel $C_{21}H_{26}O_3$. Die bevorzugte Abspaltung von CH_3CO· im Massenspektrum (Abb. 15) erinnert stark an die Verbindung (I) (MS. Abb. 5). Die wesentlichen Schlüsselbruchstücke M-15, M-57, M-58, M-114 und M-115 legen den Verdacht nahe, daß die beiden Verbindungen analog gebaut sind und sich nur im Gehalt von zwei Wasserstoffatomen unterscheiden. (s. Fragmentierungsschema 8.1)

Da die Verbindung weder acetylierbare noch trimethylsilylierbare Hydroxylgruppen enthält, dürfte ihr wahrscheinlich die Struktur (IV) zukommen. Eine derartige Verbindung könnte durch oxidativen Ringschluß aus (I) entstehen.

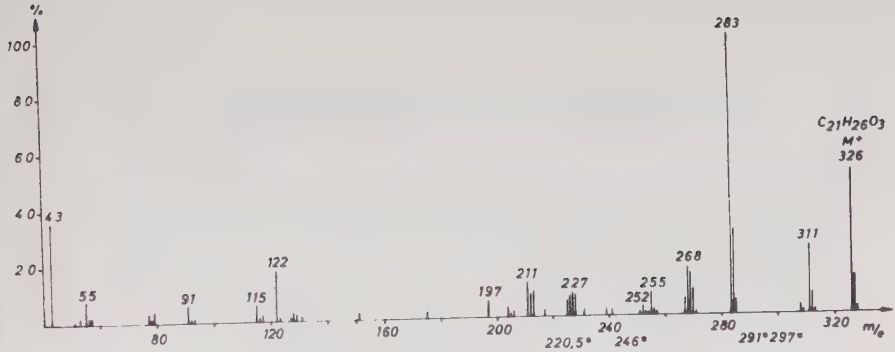
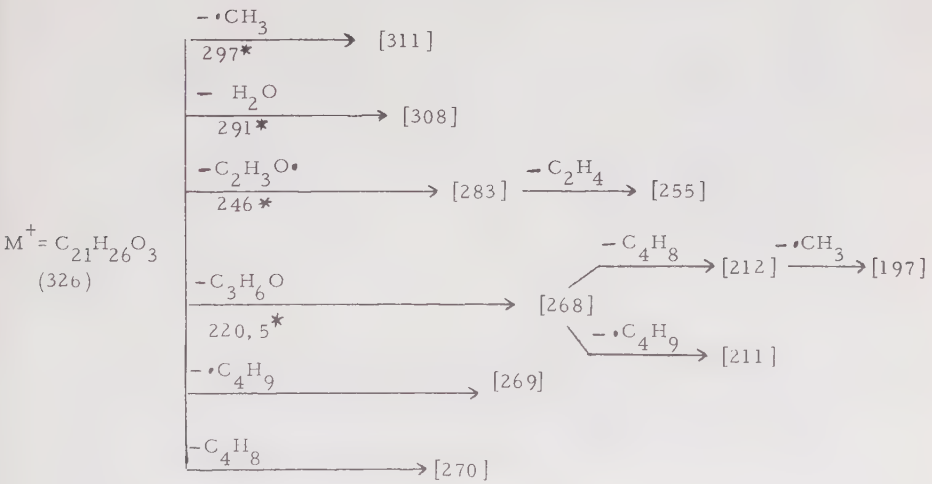
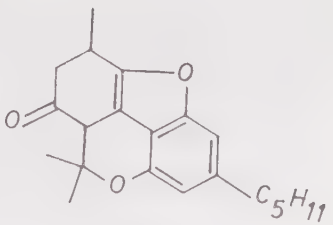


Abb. 15 : Massenspektrum der Verbindung mit dem MG 326 (IV) aus dem Peak 4 des GC Abb. 2a und 2b

8.1 Fragmentierungsschema der Verbindung (IV)



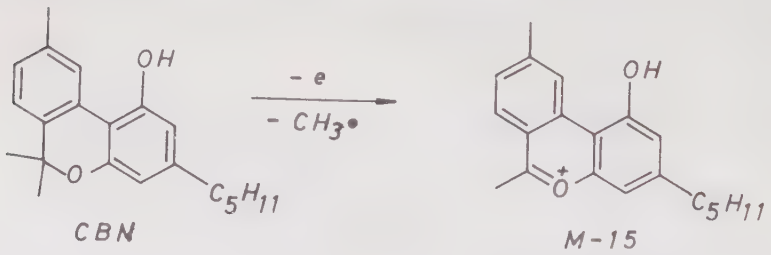
(IV)



5-Oxo- Δ^2-furano-tetrahydrocannabinol

9. Die Verbindung mit dem MG 328 (V) aus dem Peak 7

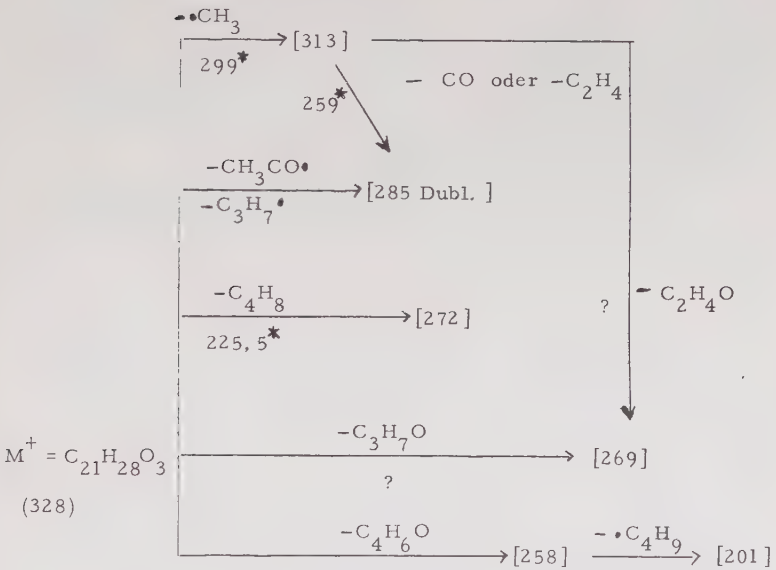
Neben der Verbindung (III) wurden etwa 1,8 mg eines Cannabinoids mit dem MG 328 (V) aus dem Peak 7 des GC (Abb. 2a) isoliert. Die Summenformel $C_{21}H_{28}O_3$ zeigt, daß die Verbindung ein Isomeres von (I) ist. Im Gegensatz zu (I) ist das Massenspektrum von (V) (Abb. 16) durch ein M-15 Bruchstück hoher Intensität charakterisiert (m/e 313 = Basispeak). Derartig bevorzugte M-15-Ionen treten immer dann auf, wenn durch Methylabspaltung ein besonders stabilisiertes Ringsystem entstehen kann. Deutlich ist dies z. B. im Massenspektrum des CBN (Abb. 11) zu erkennen. Dort entsteht das M-15 Bruchstück auf folgende Weise [75]:



Weiterhin läßt sich aus den Abspaltungen von CH_3CO• (⟶ m/e 285) und C_4H_6O (⟶ m/e 258) im MS von (V) folgern, daß sich im nichtaromatischen Ring des Moleküls eine dritte Sauerstoffunktion befindet.

Das Ion m/e 258 verliert noch ein Butylradikal (⟶ m/e 201), was ebenso wie die Abspaltung von Buten aus dem Molekülion dem Verlust der Amyl-Seitenkette am Aromaten entspricht.

9.1 Fragmentierungsschema der Verbindung (V)



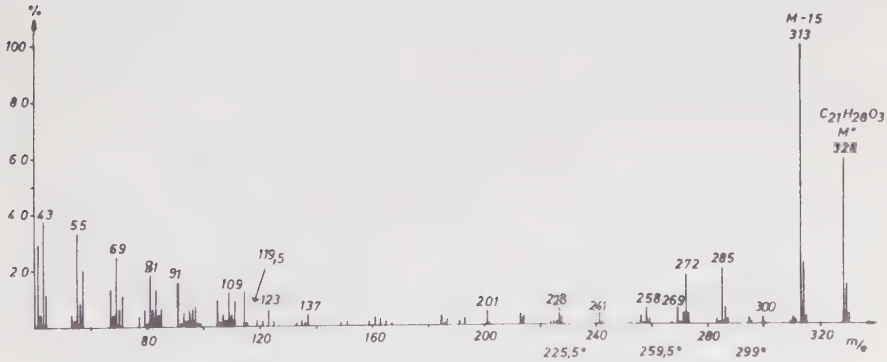


Abb. 16 : Massenspektrum der Verbindung mit dem MG 328 (V) aus dem Peak 7 des GC vom Grünen Afghanen

9.2 Weitere spektroskopische Befunde der Verbindung (V)

Das NMR-Spektrum von (V) in der Abb. 17 zeigt eine n-Pentylseitenkette durch folgende Signale an : δ = 0,88 ppm , t, J = 6 Hz (aliphatische CH_3-Gruppe) ; δ = 1,3-1,4 ppm, Multiplett unter dem Protonen-Gebirge, (3 aliphatische Methylene) und δ = 2,46 ppm, t, J = 6 Hz (benzylische Methylengruppe).

Peaks für zwei metaständige aromatische Protonen erscheinen bei δ = 6,11 ppm und δ = 6,28 ppm.

Ein scharfes Singulett bei δ = 1,24 ppm ist zwei Methylgruppen in äquivalenter chemischer Umgebung zuzuordnen. Analoge Signale erscheinen im NMR-Spektrum des(aromatischen)CBN bei δ = 1,58 ppm ebenfalls als Singuletts (vergl. Abb. 14).

Der Peak bei δ = 1,41 ppm gehört zu einem Dublett, dessen zweiter Peak teilweise unter dem Protonenberg von δ = 1,2-1,4 ppm verborgen ist. Mit einer Kopplungsaufspaltung von J = 6 Hz und einer chemischen Verschiebung von δ = 1,38 ppm entspricht dieses Dublett einer um 0,2 ppm zu tieferem Feld verschobenen Ringmethylgruppe. Das dazugehörige Multiplett des Methin-Protons ist bei dem relativ starken Untergrund nicht auszumachen.

Ein Proton, das mit D_2O austauscht, erscheint bei δ = 9,72 ppm. Seine Charakteristik (ein scharfes Singulett , anstelle der sonst üblichen breiten Bande – vergl. NMR des THC und CBN (Abb. 6b und 14)sowie von(III) (Abb. 13))– und seine Lage (stark zum Bereich azider Protonen verschoben) legen die Vermutung nahe, daß es eine phenolische Gruppe anzeigt, die an einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt ist.

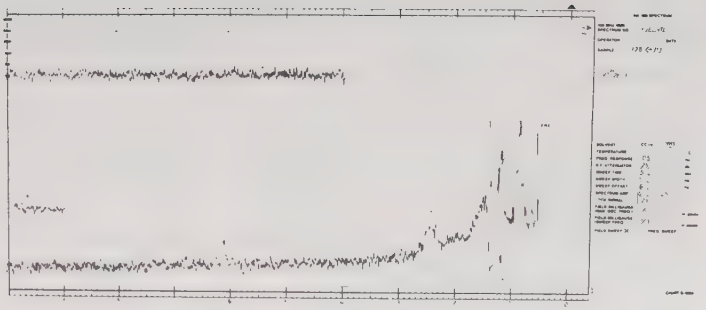


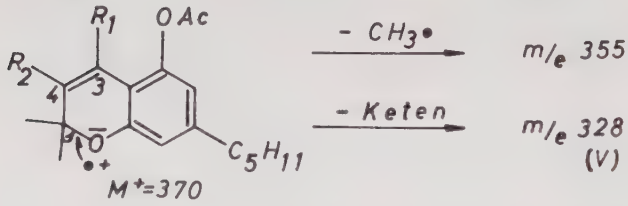
Abb. 17 : Kernresonanzspektrum der Verbindung (V)

Im IR-Spektrum (KBr) sind die phenolische Gruppe bei 3400 cm^{-1} sowie zwei geminale Methylgruppen durch symmetrische Banden bei 1362 cm^{-1} und 1385 cm^{-1} zu erkennen. Von besonderer Bedeutung für die Strukturermittlung ist eine Bande bei 1650 cm^{-1} im Carbonylbereich, die eindeutig einem α, β ungesättigtem Keton zuzuordnen ist. Für die Beteiligung dieser Carbonylgruppe an einer Wasserstoffbrückenbindung spricht die Verschiebung zu tieferer Frequenz [89].

9.3 Derivatisierung der Verbindung (V)

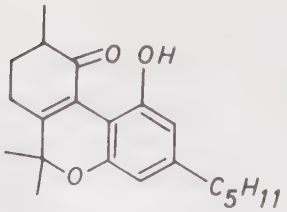
Da bei der Acetylierung von (V) eine Acetylgruppe eingeführt wird, (M^+ 370 = 328 + 42 ME) ist die Anwesenheit nur einer phenolischen Gruppe bestätigt. Wie schon im Massenspektrum des freien Phenols (Abb. 16) findet man auch hier wieder ein intensives M-15 Ion. Die Abspaltung eines Methylradikals konkurriert sogar mit der bei Cannabinoidacetaten sonst allein üblichen Eliminierung von Keten. Verantwortlich für diese auch im Vergleich zum Isomeren (I)

bevorzugte Fragmentierung dürfte eine günstige Lage der Doppelbindung sein, so daß bei Verlust einer Methylgruppe ein zum Benzolring konjugiertes Doppelbindungssystem entstehen kann :



Nimmt man für die Doppelbindung die benzylische Position C-3/C-4 an, so ist auch das Auftreten eines Signals für die geminalen, nunmehr chemisch äquivalenten Methylgruppen und die Abwesenheit olefinischer Protonen im NMR-Spektrum befriedigend erklärt.

Die zur Doppelbindung in Konjugation stehende Carbonylgruppe muß eine H-Brückenbindung zur phenolischen Gruppe ausbilden können, was nur von der Position am C-2 aus möglich ist. Zugleich ist sie die Ursache für die im NMR-Spektrum beobachtete Entschirmung der Methylgruppe am C_1-Atom.
Somit ergibt sich für die Verbindung (V) die folgende Struktur :



(V) 2-Oxo- Δ^3-tetrahydrocannabinol

Bei der Hydrierung von (V) wurden zwei Wasserstoffatome aufgenommen (M^+ = 330), obwohl eine tetrasubstituierte Doppelbindung

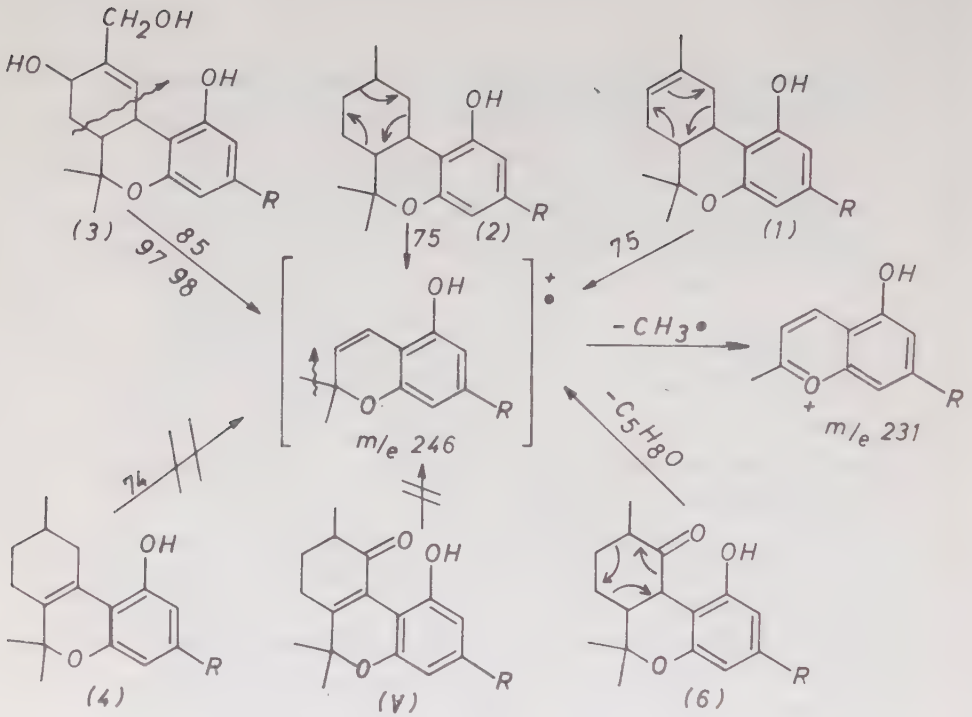
vorliegt. Dies ist erklärlich, weil die Doppelbindung durch die Carbonylgruppe polarisiert ist.

Die im Massenspektrum (Abb. 18) auftretenden Schlüsselbruchstücke stützen den Strukturvorschlag. Die Ionen der Masse 313, 285 und 272 sind jeweils um 2 ME schwerer geworden. Ihre Entstehung aus dem Molekülion wurde bereits bei (V) diskutiert.

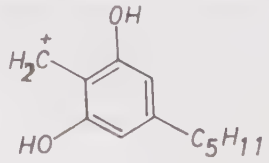
Auffallend ist, daß in der hydrierten Verbindung die Abspaltung einer Methylgruppe aus dem Molekülion kaum von Bedeutung ist. Das ist auf den Verlust der Doppelbindung zurückzuführen, die in der Position zwischen C-3 und C-4 entscheidend zur Ladungsdelokalisierung beitragen konnte.

Aufschlußreich ist auch das Auftreten von Schlüsselionen der Masse 246, 231 und 193, deren Entstehung in den Massenspektren verschiedener Cannabinoide diskutiert wurde[75]. So kann beispielsweise durch einen Dien-Zerfall von $\Delta^{1(6)}$-THC (1), durch Abbau des Cyclohexanringes im Hexahydro-CBN (2) oder durch Verlust eines mit Sauerstoff substituierten Ringes (3) das Ion m/e 246 gebildet werden, das seinerseits leicht eine Methylgruppe zum Ion der Masse 231 abspaltet. Diese Fragmentierung ist kaum möglich, wenn sich die Doppelbindung schon in der Ausgangsverbindung in der Stellung C-3/C-4 befindet wie im Δ^{3}-THC (4) und der Verbindung (V). Die Spaltreaktion für das Hydrierungsprodukt von (V) läßt sich dann in der gleichen Weise formulieren (6).

Der Verlust des Cyclohexanringes erfolgt allerdings auch in einem zweistufigen Prozeß : nach der Eliminierung von CO aus dem Molekülion (⟶ m/e 302) wird noch Buten abgespalten (⟶ m/e 246), (vergl. Fragmentierungsschema 9.4).



Das Auftreten des Ions m/e 193 entspricht dem Spaltstück der gleichen Masse, das aus einigen anderen Cannabinoiden immer dann gebildet wird, wenn – wie in diesem Fall – sich zwischen der C-3 und C-4 Position keine Doppelbindung befindet. Denn im Zuge seiner Entstehung wird ein Wasserstoffatom auf das α-ständige C-Atom zwischen den beiden Sauerstoffunktionen des Olivetylrestes übertragen.



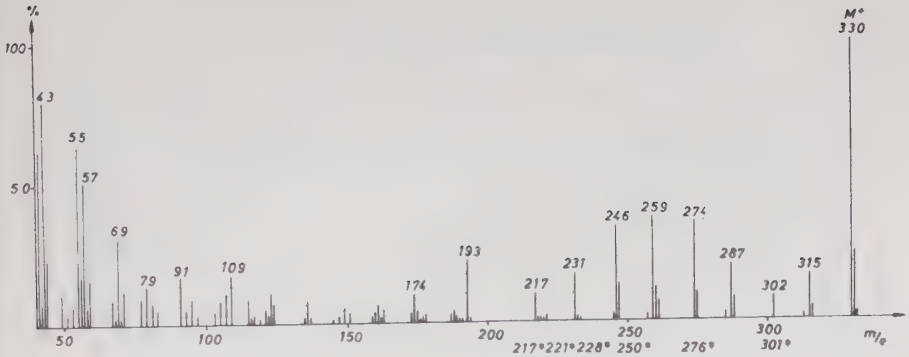
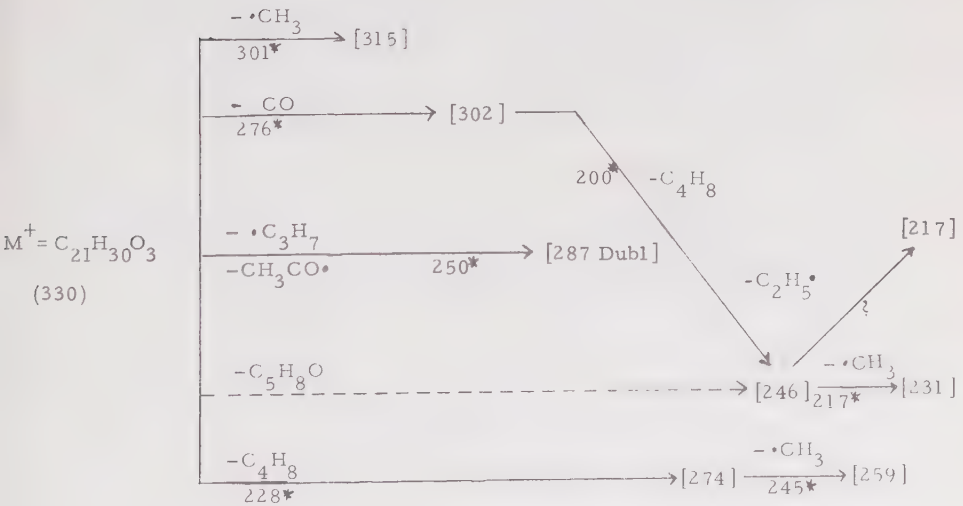


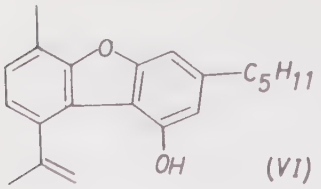
Abb. 18 : Massenspektrum des Hydrierungsprodukts der Verbindung (V)

9.4 Fragmentierungsschema des Hydrierungsprodukts von (V)



10. Die Verbindung mit dem MG 308 (VI)

Der Peak 5 der Gaschromatogramme (Abb. 2a und 2b) enthält neben dem THC in geringer Menge eine Verbindung mit dem Molekulargewicht 308 ($C_{21}H_{24}O_2$). Dies entspricht der Bruttoformel des CBN bzw. des Isomeren (III) mit einem zusätzlichen Doppelbindungsäquivalent. Als überragende Spaltstücke im Massenspektrum (Abb. 19) treten Ionen der Masse 251 und 252 auf, die den Verlust einer am Aromaten gebundenen Pentylseitenkette anzeigen. Zu bemerken ist, daß die Abspaltung einer Methylgruppe im Vergleich zum Fragmentierungsprozeß beim CBN (Abb. 12) fast völlig unterdrückt wird. Offenbar kann sich kein entsprechendes Chromenylsystem ausbilden. In geringem Umfang verliert das Teilchen m/e 252 eine Methylgruppe (⟶ m/e 237) bzw. CHO· (⟶ m/e 223). Durch Acetylierung und Trimethylsilylierung wird jeweils ein Monosubstitutionsprodukt erhalten. Beim Versuch der Hydrierung mit $Pd/CaCO_3$ wurde kein Wasserstoff aufgenommen. Erst unter schärferen Bedingungen (mit PtO_2) konnte ein Produkt erhalten werden, dessen Massenspektrum mit dem der Verbindung (III) identisch war. Für die Verbindung (VI) ist daher die folgende Struktur wahrscheinlich gemacht :



(VI)

1-Hydroxy-9-isopropenyl-6-methyl-3-pentyl-dibenzofuran

Leider reichte die Menge der isolierten Verbindung (VI) nicht für die Aufnahme eines Kernresonanzspektrums aus.

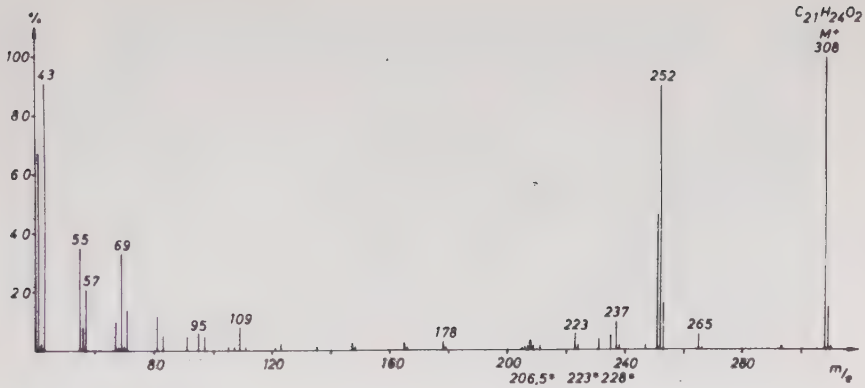
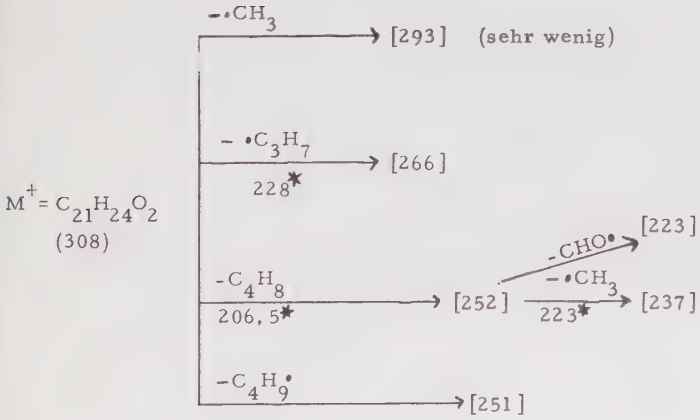


Abb. 19: Massenspektrum der Verbindung mit dem MG 308 (VI)

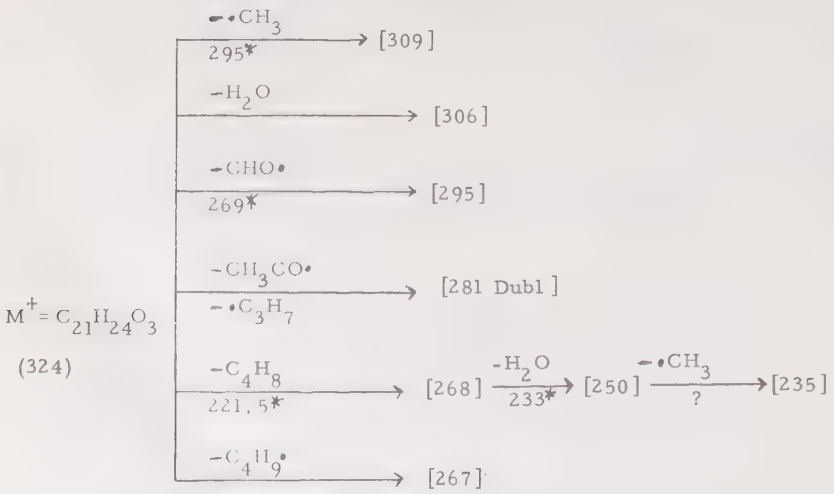
10.1 Fragmentierungsschema der Verbindung (VI)



11. Die Verbindung mit dem MG 324 (VII) aus dem Peak 5

In etwas größerer Menge als (VI) ist im Peak 5 der Gaschromatogramme (Abb. 2a, 2b) ein Cannabinoid mit dem MG 324 und der Summenformel $C_{21}H_{24}O_3$ enthalten. Formal besitzt (VII) somit ein Sauerstoffatom mehr als die Verbindung (VI). Das Massenspektrum (Abb. 20) ist durch ein Ion der Masse 295 charakterisiert, das den Verlust von $\bullet$CHO anzeigt. Solche Spaltungsreaktionen sind für Di- und Polyhydroxyphenole typisch [81]. Die Gegenwart der Pentylseitenkette wird durch Auftreten von Schlüsselionen der Masse 268 ($M-C_4H_8$) und 267 ($M-C_4H_9$) nahegelegt. Daneben treten in geringem Umfang Bruchstücke auf, die die Abspaltung einer Methylgruppe (M-15) und Wasser (M-18) anzeigen. Die Wassereliminierung ist bei der Bildung des Ions m/e 250 aus m/e 268 noch einmal begünstigt. Das Ion m/e 281 ist ein Dublett und entsteht durch Eliminierung von $CH_3CO\bullet$ bzw. $C_3H_7\bullet$ aus dem Molekülion.

11.1 Fragmentierungsschema der Verbindung (VII)



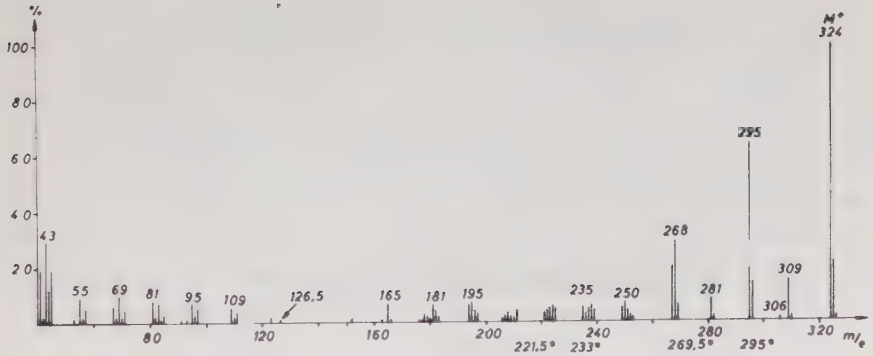


Abb. 20 : Massenspektrum der Verbindung mit dem MG 324 (VII)

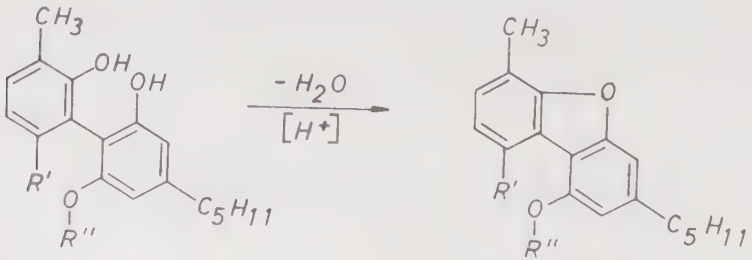
Für die Messung eines normalen NMR-Spektrums reichte die Substanzmenge nicht aus, da sie nur sehr schwierig durch Dünnschichtchromatographie von den Verbindungen (VI) und (X) abzutrennen ist. Die Cat-Aufnahme des NMR-Spektrums zeigt die Anwesenheit einer aromatischen Methylgruppe (Singulett bei δ = 2,54 ppm) an. Aromatische Protonen werden durch Peaks bei δ = 6,60 ppm und δ = 6,92 ppm angezeigt. Ferner traten im olefinischen Bereich zwei Peaks bei δ = 4,53 ppm und δ = 4,75 ppm auf, die einer endständigen Methylengruppe zugeordnet werden könnten. Der Bereich der olefinischen und aliphatischen Methylgruppen war zu schlecht aufgelöst, um verwertbare Informationen zu erhalten. Die zur Seitenkette gehörige benzylische Methylengruppe erschien als Triplett bei δ = 2,66 ppm.

Bei der Hydrierung mit $Pd/CaCO_3$ wird kein Wasserstoff aufgenommen. Bei der Acetylierung entsteht eine Monoacetylverbindung (M^+ 366 = 324 + 42 ME). Als Nebenprodukt wird außerdem eine

Verbindung mit dem MG 306, die im MS die unveränderte Seitenkette abspalten kann (Ionen bei M-56 und M-57) gebildet. Offensichtlich hat (VII) während der Veresterungsreaktion teilweise Wasser abgespalten. Das Nebenprodukt mit dem MG 306 ist anscheinend nicht mehr acetylierbar, denn ein entsprechendes Ion der Masse m/e 348 (= 306 + 42 ME) tritt nicht auf.

Für einen Strukturvorschlag reichen die vorhandenen Informationen nicht aus.

Bei zukünftigen Arbeiten erscheint es mir dennoch zweckmäßig als Arbeitshypothese von einer Struktur auszugehen, die einen aromatischen Ring mit einer gesättigten Amylseitenkette enthält. Ferner wird nahegelegt, daß zwei phenolische Gruppen so zueinanderstehen, daß sie durch Säureeinwirkung (Acetylierungsreaktion) leicht Wasser verlieren und evtl. zu einem Dibenzofuranderivat cyclisieren, das eine weitere nicht acetylierbare Sauerstofffunktion, z. B. eine sterisch gehinderte Phenolgruppe, trägt. Eine Methylgruppe ist an einem aromatischen Ring gebunden.



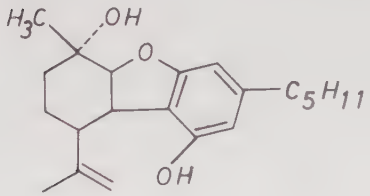
MG 324 MG 306

(VII)

hypothetisch

12. Cannabielsoin-I (VIII) und die Verbindung (IX)

Nach dünnschichtchromatographischer Vortrennung von Extrakten aus dem Schwarzen und Grünen Afghanen wurde nach der GC-Trennung im Bereich des THC-Peaks (Peak 5) eine Verbindung mit dem MG 330 eluiert. Nach einer weiteren DC-Trennung konnte schließlich das Massenspektrum in Abb. 21 erhalten werden. Es ist identisch mit dem kürzlich auf einem Vortrag von W. Heerma et al.*) gezeigten und diskutierten Spektrum [86] für Cannabielsoin I [67] (VIII).



VIII Cannabielsoin-I.

Bei der Acetylierung und Trimethylsilylierung von (VIII) erhielten wir erwartungsgemäß jeweils ein Monosubstitutionsderivat, weil die tertiäre Alkoholgruppe nicht reagiert.

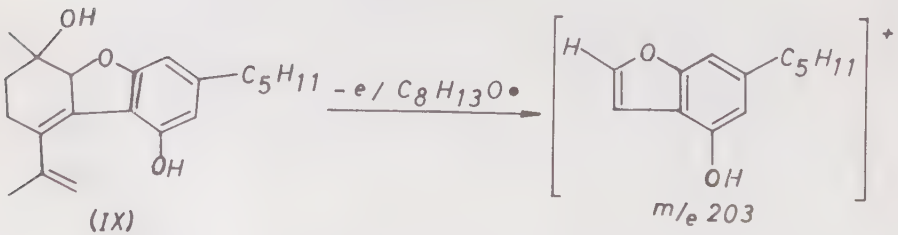
Eine zweite Verbindung (IX) mit dem MG 328 ($C_{21}H_{28}O_3$) konnte ebenfalls nach DC-Vortrennung eines Cyclohexan-Extraktes des Grünen Afghanen mit der Kopplung GC/MS nachgewiesen werden (MS Abb. 22). Beim Vergleich der für (VIII) und (IX) erhaltenen Spektren zeigte sich, daß die Schlüsselbruchstücke von (IX) mit den MZ. 245, 203, 146, 145, 133 und 106 um zwei Masseneinheiten

*) Die Autoren waren so freundlich, uns das Manuskript ihrer im Druck befindlichen Publikation ("Tetrahedron") zur Verfügung zu stellen.

gegenüber den entsprechenden Fragmenten im MS von (VIII) leichter sind. In ihm muß demnach ein zusätzliches Doppelbindungsäquivalent enthalten sein.

Der Basispeak M-125 im Spektrum von (VIII) (m/e 205) entsteht durch Verlust von $\bullet C_8H_{13}O$. Er beinhaltet den aromatischen Teil des Moleküls, der in einer Folgereaktion noch seine gesättigte C_5-Seitenkette abspaltet [86].

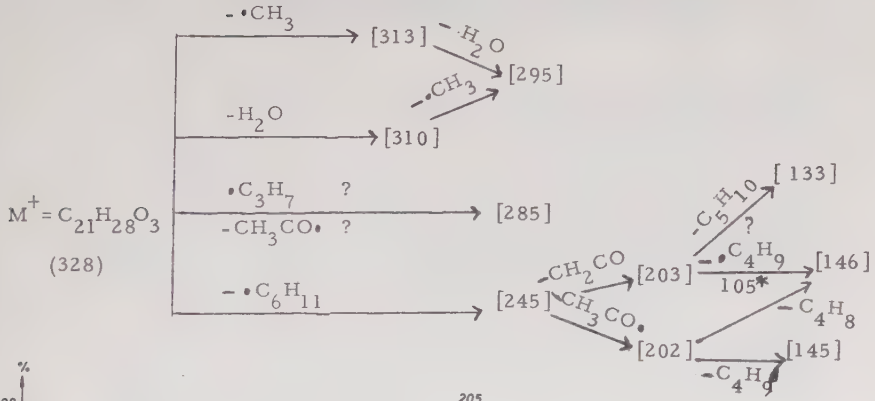
Da das entsprechende Ion m/e 203 im MS von (IX) ebenfalls durch Verlust von $\bullet C_8H_{13}O$ entsteht und die weitere Abspaltung von C_4H_8 bzw. $\bullet C_4H_9$ noch die Anwesenheit der gesättigten C_5-Seitenkette in diesem Ion beweist, könnte die zusätzliche Doppelbindung von (IX) in der energetisch günstigen benzylischen und zur schon vorhandenen Doppelbindung konjugierten Lage stehen. Ein Dienzerfall leitet dann die Bruchstückbildung ein. Somit könnte die Verbindung mit dem MG 328 die Struktur eines Dehydrocannabielsoins (IX) haben. Der lediglich auf dem Massenspektrum und dem Vergleich mit Cannabielsoin beruhende Strukturvorschlag für (IX) müßte nach Isolierung und Anreicherung der Verbindung noch durch weitere spektroskopische Daten erhärtet werden.



(IX) m/e 203

Dehydrocannabielsoin

12.1 Fragmentierungsschema der Verbindung (IX)



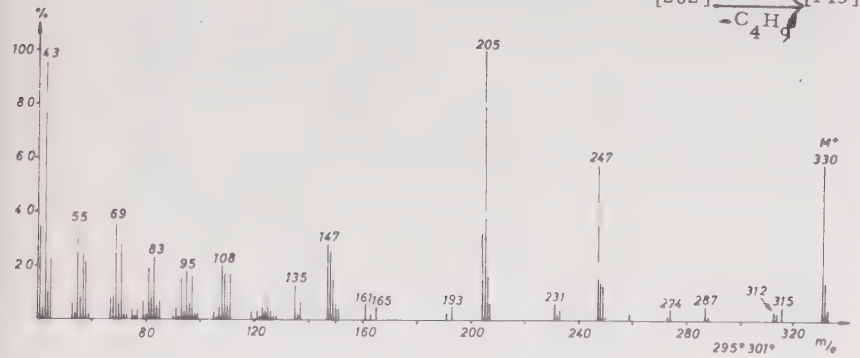


Abb. 21 : Massenspektrum von Cannabielsoin-I

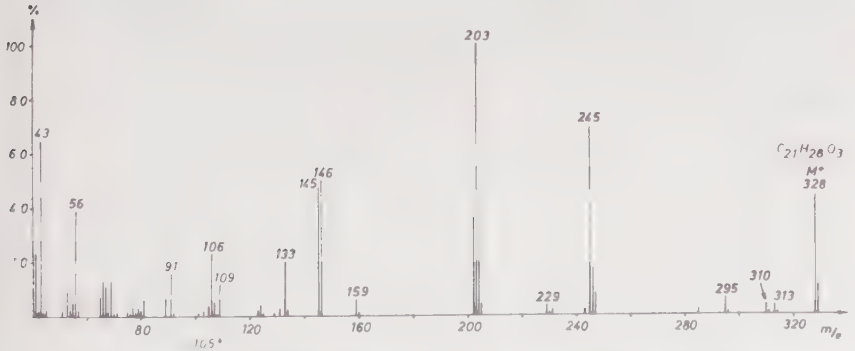


Abb. 22 : Massenspektrum von Dehydrocannabielsoin (IX)

13. Die Verbindung mit dem MG 310 (X) aus dem Peak 5

Nach der präparativen DC-Trennung des THC-Peak (Peak 5) aus dem Grünen Afghanen wurde eine Zone eluiert, welche die Verbindungen (VI), (VII) und eine mit dem MG 310 (X) im Gemisch enthielt. Durch einen weiteren Trennschritt in der GC/MS-Kopplung wurde das in Abb. 23 gezeigte Spektrum erhalten. Der Summenformel ($C_{20}H_{22}O_3$) nach enthält diese Verbindung ein C-Atom weniger als die übrigen Cannabinoide. Als überragendes Ion im Massenspektrum tritt das Ion M-56 auf, das begleitet von einem M-57-Fragment den Verlust einer C_5-Seitenkette anzeigt. Auffallend ist die schon im MS von (VII) beobachtete Abspaltung von •CHO aus dem Molekülion, dem das Ion m/e 281 seine Entstehung verdankt. Die Eliminierung von Wasser aus dem Teilchen M-56 findet ebenfalls bei beiden Verbindungen statt und deutet auf strukturelle Übereinstimmungen hin. Die Ionen mit den MZ 267 und 268 entstehen durch Verlust eines Methylradikals bzw. Keten, was auf eine acetylierte Hydroxylgruppe (Phenol) hinweist. Ein Teil der Gemischfraktion aus der DC-Zone wurde acetyliert und ergab u. a. auch eine Verbindung mit dem MG 352 die einem Monosubstitutionsderivat von (X) entsprach. Da für diese Verbindung keine weiteren Informationen vorliegen, muß auf einen Strukturvorschlag verzichtet werden.

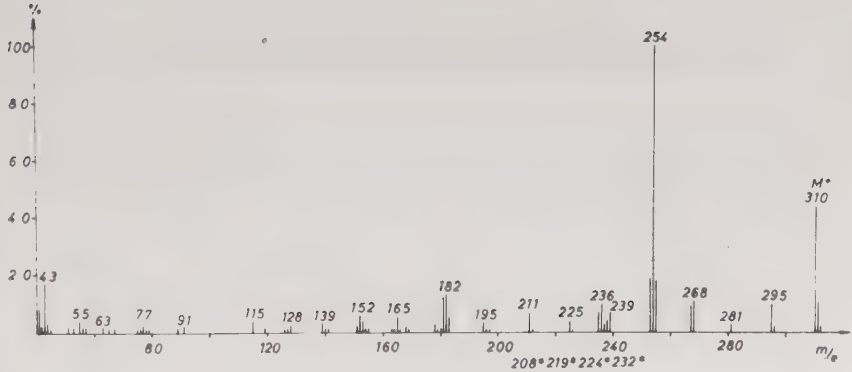
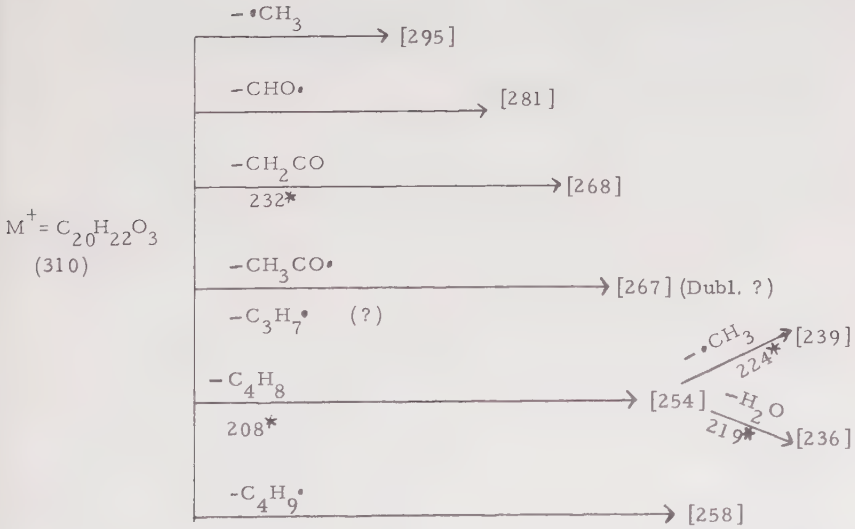


Abb. 23 : Massenspektrum der Verbindung mit dem MG 310 (X) aus dem Peak 5

13.1 Fragmentierungsschema der Verbindung (X)



14. Die Verbindung mit dem MG 328 (XI) aus dem Peak 6

Nach der präparativen Dünnschichtchromatographie des Cannabinol-Peaks (P. 6) aus dem GC des Grünen Afghanen (Abb. 2a) konnte in geringer Menge aus einer Zone eine Verbindung mit dem MG 328 (XI) isoliert werden. Die Summenformel ($C_{21}H_{28}O_3$) und auch das Fragmentierungsmuster im Massenspektrum (Abb. 24) zeigen eine auffallend große Ähnlichkeit mit der Verbindung (I). Bei (XI) ist jedoch die Bildung des Ions M-15 und die Entstehung des Teilchens m/e 231 im Vergleich zu (I) begünstigt. Höchstwahrscheinlich handelt es sich bei (XI) um ein Stereomeres oder Doppelbindungsisomeres von (I), wobei das Ion m/e 231 jedoch ein Δ^3-Isomeres ausschließt (vergl. S. 44). Auf die Wiedergabe eines Fragmentierungsschemas wird verzichtet, weil es im wesentlichen mit dem des Isomeren (I) übereinstimmt. Ungeklärt ist, warum sich (I) und (XI) so sehr in den Retentionszeiten des Gaschromatogramms unterscheiden.

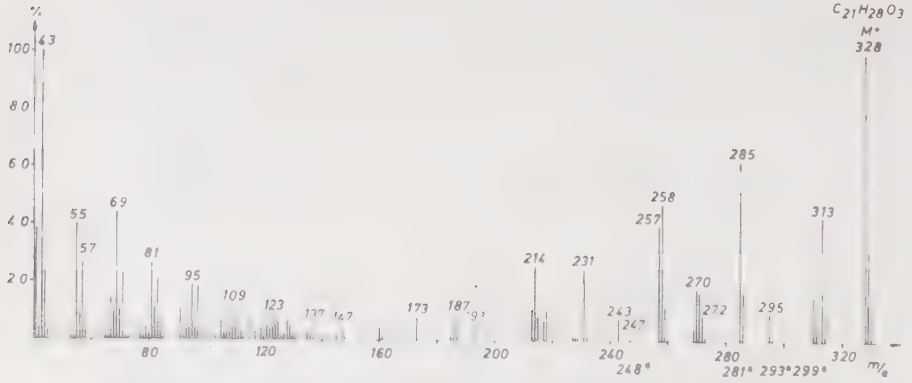


Abb. 24 : Massenspektrum der Verbindung mit dem MG 328 (XI) aus dem Peak 6

15. Die Verbindung mit dem MG 326 (XII) aus dem Peak 5

In der "Nachschulter" des THC-Peaks (P. 5, GC Abb. 2a) ist eine Verbindung mit dem MG 326 (XII) enthalten. Nach DC-Trennung des Peaks 5 wurde eine Zone eluiert, in der (XII) angereichert ist. Als Beimengungen enthält diese Fraktion noch THC, eine Verbindung mit dem MG 344 ($C_{21}H_{28}O_4$) sowie etwas CBN, das durch Oxidation des THC entstanden sein dürfte. Nach weiterer Trennung in der GC/MS-Kombination wird das Spektrum von (XII) (Abb. 25) erhalten. Die Summenformel ($C_{21}H_{26}O_3$) und ein ähnliches Fragmentierungsverhalten weisen (XII) als ein Isomeres der schon beschriebenen Verbindung (IV) aus.

Die Bildung des Schlüsselbruchstücks m/e 283 ist bei (XII) nicht mehr so begünstigt wie bei der Verbindung (IV) und die Abspaltung von (C_3H_6O) zu einem Ion mit der MZ 268 (wie bei (IV) ist bei (XII) nicht zu beobachten.

Ein weiterer Unterschied gegenüber (IV) ist das Auftreten eines Schlüsselions der Masse m/e 173 ($C_{11}H_9O_2$). Es ist aus dem Molekülion durch Abspaltung von ($C_{10}H_{17}O$) entstanden und sollte den aromatischen Teil des Moleküls, der schon seine C_5-Seitenkette als Buten abgespalten hat, beinhalten.

Beim Versuch der Acetylierung erhält man ein Monoacetat. Das Molekülion (M^+ 368 = 326 + 42 ME) spaltet Keten ab und zeigt dann das Spektrum der Ausgangsverbindung. Somit hat (XII) im Gegensatz zu seinem Isomeren (IV) eine acetylierbare phenolische Hydroxylgruppe.

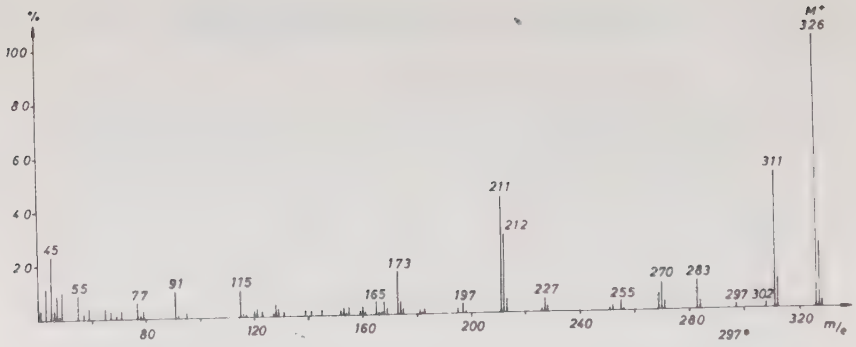


Abb. 25 : Massenspektrum der Verbindung mit dem MG 326 (XII) aus dem Peak 5

Um weiteren Einblick in die Spaltreaktionen zu gewinnen, wurde (XII) methyliert. Dadurch wurden die Bruchstücke mit den folgenden Massenzahlen um 14 ME schwerer :

311 = $M-CH_3$
283 = $M-C_3H_7$; $M-CH_3CO$
270 = $M-C_4H_8$
269 = $M-C_4H_9$
212 = $M-C_7H_{14}O$
211 = $M-C_7H_{15}O$
197
195

Leider reichen diese Informationen nicht für einen Strukturvorschlag aus.

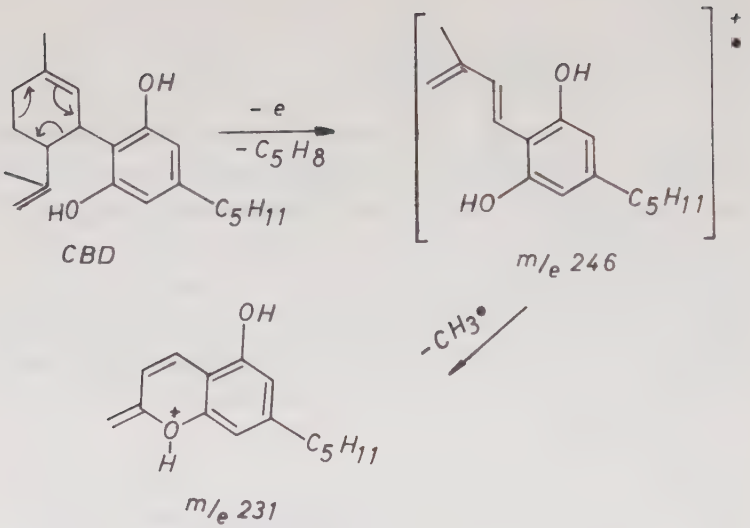
16. Cannabichromen (XIII)

Nach DC-Trennung des Cannabinoidgemisches aus dem Peak 2 des GC (Abb. 2a) wurde als Hauptkomponente eine Verbindung mit dem MG 314 ($C_{21}H_{30}O_2$) (XIII) isoliert. Das Massenspektrum (Abb. 26) zeigt ein überragendes Ion bei der Masse 231 und ein wichtiges Schlüsselbruchstück bei der Masse 174. Das Molekülion und die Ionen im oberen Massenbereich M-15, M-43 und M-57 sind von geringer Intensität. Ein Vergleich des Fragmentierungsverhaltens von (XIII) mit CBD, dessen Massenspektrum in (Abb. 27) gezeigt wird [x], ist recht aufschlußreich.

In beiden Verbindungen tritt das Ion m/e 231 als Basispeak auf. Für seine Entstehung beim Zerfall des CBD wurden zwei Erklärungen herangezogen [75]. Zu einem Teil dürfte eine Cyclisierung des CBD zum THC stattfinden, aus dem (wie auf S. 44 formuliert) nach einem Dienzerfall das Fragment m/e 246 entsteht, welches sich dann durch Abspaltung von $\cdot CH_3$ weiter zum aromatischen Ion mit der Masse 231 stabilisiert. Andererseits lassen sich die beobachteten Ionen auch durch direkten Zerfall von CBD wie folgt erklären :

---

x) Das MS von CBD wurde schon von Budzikiewicz et al. veröffentlicht [75]. Jedoch weist das in der Literatur publizierte Spektrum, verglichen mit dem in der Abb. 27, Mängel auf. Zum einen wurden früher die Ionen erst von der Masse m/e 100 an aufwärts registriert und zum anderen sind die höheren Intensitäten von m/e 271 und m/e 258 vermutlich auf Beimengungen von THC zurückzuführen. (Vergl. die MS Abb. 31 und 32.) Unsachgemäß gelagertes CBD isomerisiert zu den isomeren THC's [90]. Das Referenzspektrum Abb. 27 wurde nach kombinierter Trennung GC/DC aus dem Peak III der Haschisch-Extrakte gewonnen.



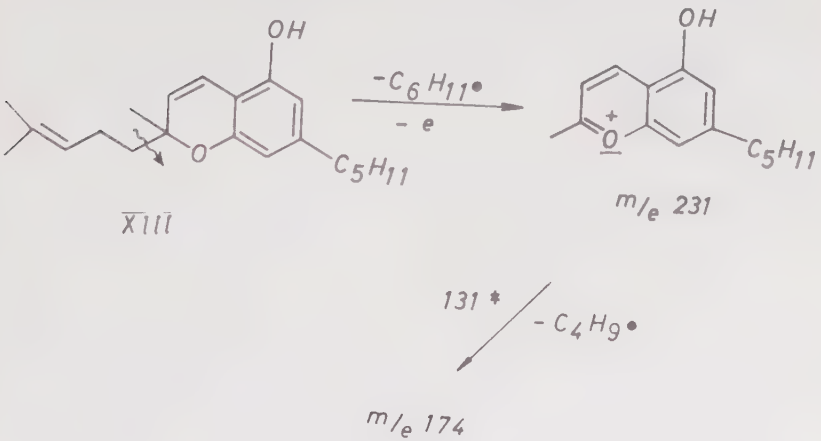
In jedem Fall entsteht auf beiden Zerfallswegen das Ion mit der Masse m/e 246 . Im Spektrum von (XIII) tritt dieses Fragment jedoch nicht auf, woraus zu folgern ist, daß es durch direkte Abspaltung von $\bullet C_6H_{11}$ aus dem Molekülion entstanden sein muß. Der weitere Abbau von m/e 231 ist offensichtlich bei CBD und (XIII) gleich : Durch Verlust der Seitenkette, die als Butylradikal abgespalten wird, entsteht das aromatische Schlüsselbruchstück m/e 174 . Die Ausbildung des Ions m/e 193 ist im Spektrum von (XIII) ebenfalls unterdrückt. Offenbar kommt der auf Seite 44 erwähnte Mechanismus [75] der Wasserstoffübertragung auf das α-ständige C-Atom zwischen den beiden Sauerstoffunktionen des Olivetylrestes nicht zum Zuge.

Zur Festlegung der phenolischen OH-Gruppen wurde (XIII) methyliert. Dem Massenspektrum des Produktes ist zu entnehmen, daß ein Mono-

methyläther entstanden ist (M^+ 328 = 314 + 14 ME). Die nunmehr methylierten Schlüsselbruchstücke m/e 231 und m/e 174 sind dementsprechend um 14 ME schwerer geworden.

Um sicher zu gehen, daß die Methylierung quantitativ abgelaufen war, wurde auch das MS einer unter gleichen Bedingungen methylierten Probe CBD registriert. Es zeigte erwartungsgemäß eine Verschiebung des MG um 28 ME und somit das Spektrum des CBD-Dimethyläthers.

Für die Verbindung (XIII) kommt damit nur die Struktur des Cannabichromens in Frage, das schon früher [52] im Haschisch nachgewiesen wurde. Die Angabe über einen Peak m/e 232 zu 95,5% neben dem Basispeak m/e 231 (100%) sind nach unseren Messungen falsch [52]. Die Abb. 26 zeigt demnach das MS von Cannabichromen (XIII).



XIII

m/e 231

m/e 174

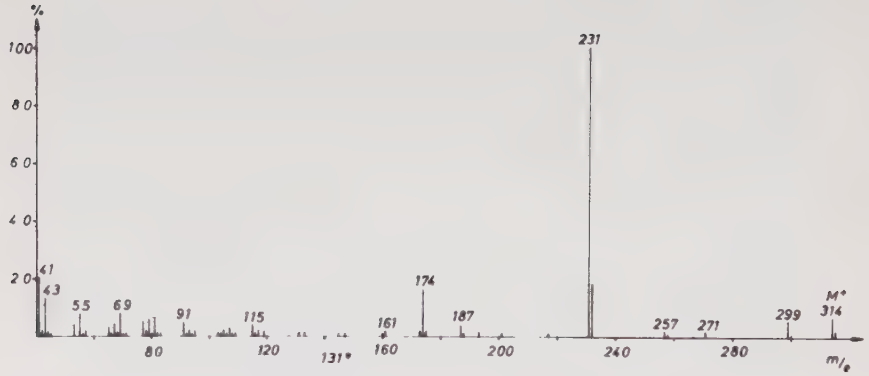


Abb. 26 : Massenspektrum des Cannabichromens (XIII)

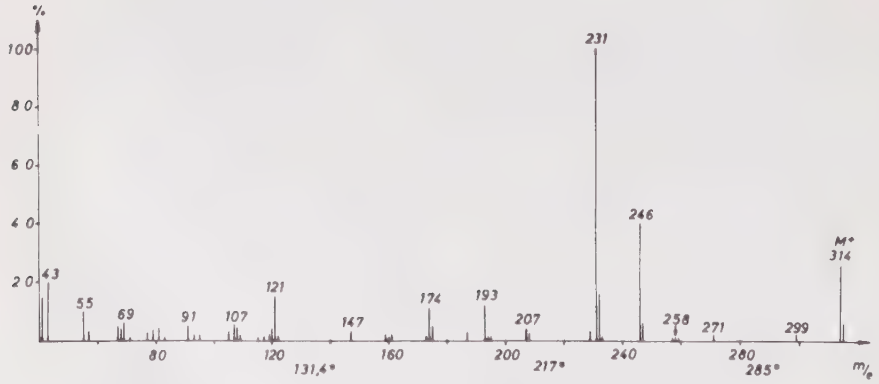


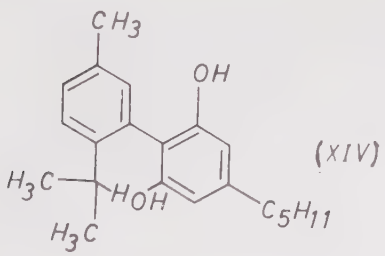
Abb. 27 : Massenspektrum des Cannabidiols (CBD)

17. Die Verbindung mit dem MG 312 (XIV)

Aus einer weiteren Zone nach DC-Trennung des Peaks 2 wurde eine Fraktion isoliert, welche als Hauptkomponente eine Verbindung mit dem MG 312 ($C_{21}H_{28}O_2$) (XIV) enthielt. (XIV) war begleitet von einer Beimengung Cannabivarin (XV).

Erst nach der Acetylierung gelang die Abtrennung im Gaschromatographen und es wurde das Spektrum in Abb. 28 erhalten. Die Verschiebung des Molekülions gegenüber der Ausgangsverbindung von 84 ME zeigt, daß ein Diacetat vorliegt (312 + 2 x 42 ME). Nach der zweimaligen Abspaltung von Keten erhält man ein Fragmentierungsmuster wie in der Ausgangsverbindung (XIV). Die Anwesenheit einer C_5-Seitenkette ist durch das Ion m/e 256 (312-56 ME) belegt. Die Ionen der Masse 231 und 193 erinnern stark an das Spektrum des CBD (Abb. 27) . Das Chromenylion m/e 231 kommt auch noch in einer acetylierten Form vor. Ein metastabiler Peak (m/e 195*) belegt die Abspaltung von Keten aus dem Fragment m/e 273 zum Ion der Masse 231.

Diese Informationen legen nahe , daß der Verbindung (XIV) die folgende Struktur zukommt :



(XIV)

4-Isopropyl-cannabinodiol

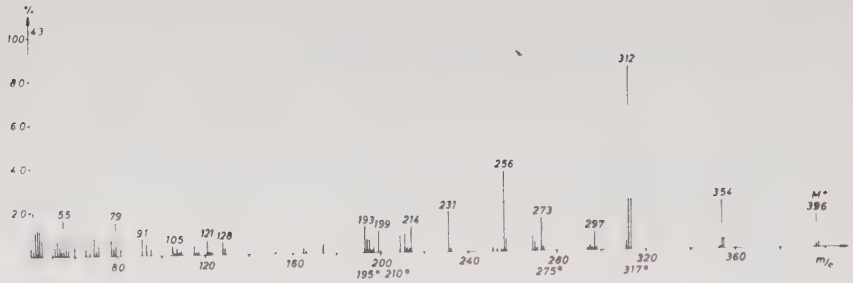


Abb. 28 : Massenspektrum des Diacetylderivates der Verbindung mit dem MG 312 (XIV)

18. Cannabivarol (XV)

In verhältnismäßig großer Menge war im Cannabidiolpeak (Peak 3) das Cannabivarol (XV) enthalten. Ein Massenspektrum dieses Propylhomologen vom CBN wurde nach DC-Trennung dieses Peaks erhalten (Abb. 29). Cannabivarol war die erste "neue" Verbindung, die ich im Verlaufe dieser Arbeit aus Haschisch gewinnen konnte. Denn schon 1971 erhielt ich nach DC-Auftrennung (Verfahren nach Korte und Sieper [68]) eines Petroläther-Extraktes vom Schwarzen Afghanen in der Zone 6, Abb. 1, dieses Homologe sauber abgetrennt. Seine Struktur war aufgrund der massenspektrometrischen Verschiebung des Schlüsselions M-15 (gegenüber dem MS des CBN um 28 ME) und dem Auftreten eines Ions der Masse 238 sowie eines doppelt geladenen Ions bei der MZ 119,5 unschwer zu erschließen. Gleichzeitig (Herbst 1971) wurde die Verbindung von Vree et al. beschrieben, die seine Struktur durch Massenfragmentographie ermittelten [35, 42].

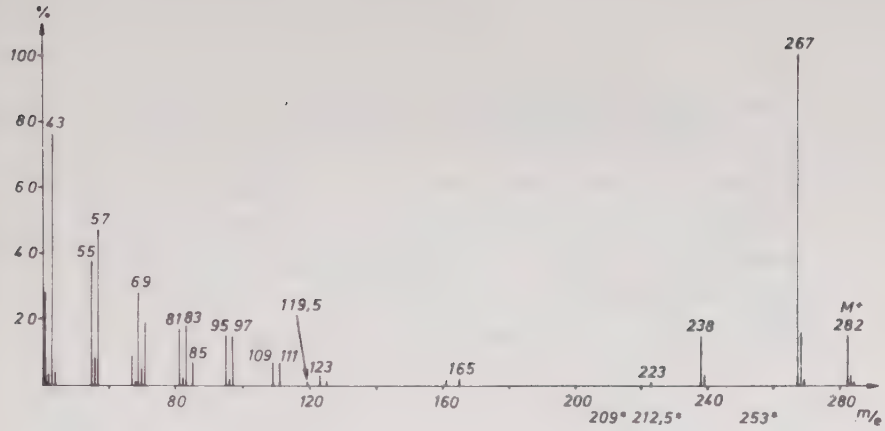
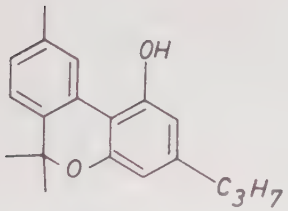


Abb. 29 : Massenspektrum von Cannabivarol (XV)



(XV)

C_3-CBN

19. Tetrahydrocannabivarol (XVI)

Ein weiteres C_3-Homologes (M^+ 286) (XVI) konnte ebenfalls nach der DC-Trennung des Peaks 2 isoliert werden. Durch Acetylierung erhöhte sich das MG von (XVI) um 42 ME und beweist somit die Anwesenheit nur einer phenolischen Hydroxylgruppe. Demnach dürfte es sich bei (XVI) um das Tetrahydrocannabivarol – einem Propylhomologen des THC – handeln, das ebenfalls von der Gruppe um Vree durch Anwendung des Verfahrens der Massenfragmentographie kürzlich entdeckt wurde [35, 42]. Wie ein Vergleich der Mas-

senspektren des (XVI)-Acetats (Abb. 30) mit denen der beiden C_5-THC-Isomeren (Abb. 31, 32) verdeutlicht, treten all jene Ionen der THC's um 28 ME verschoben im Spektrum des C_3-THC auf, die noch die Seitenkette tragen. Das gilt insbesondere für die Ionen mit dem MZ 314, 299, 271, 231 und 193. Das Schlüsselion m/e 269 im Spektrum des C_3-THC-Acetats entspricht der Abspaltung eines Acetatradikals ($CH_3CO_2^{\cdot}$) vom Molekülion.

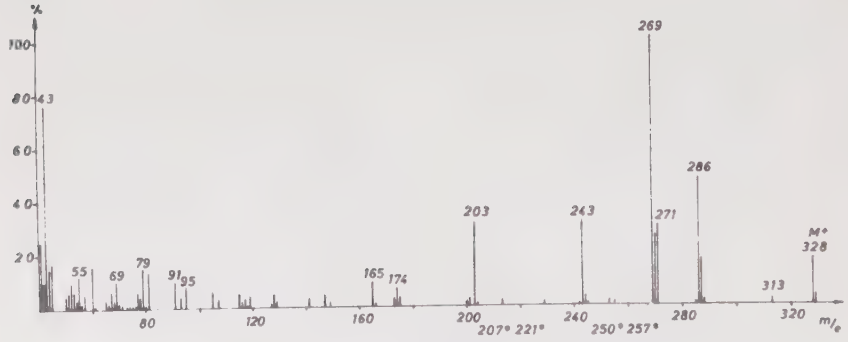
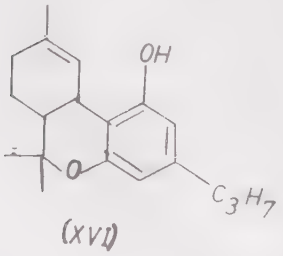


Abb. 30 : Massenspektrum des Acetylderivates vom Tetrahydrocannabivarol (XVI)



(XVI)

C_3-THC

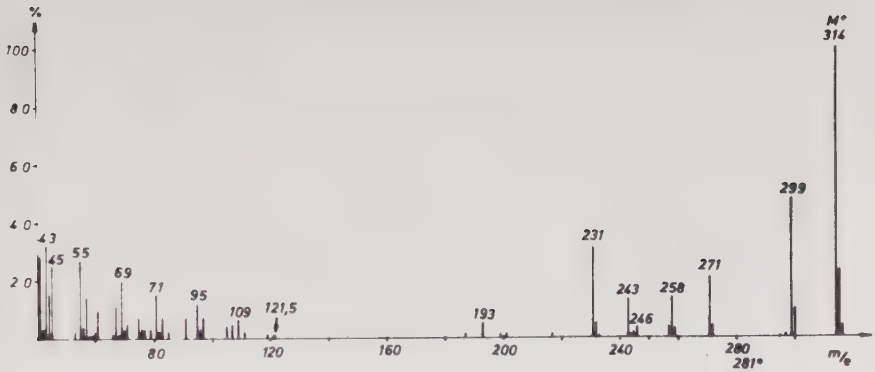


Abb. 31 : Massenspektrum des Δ^1-THC

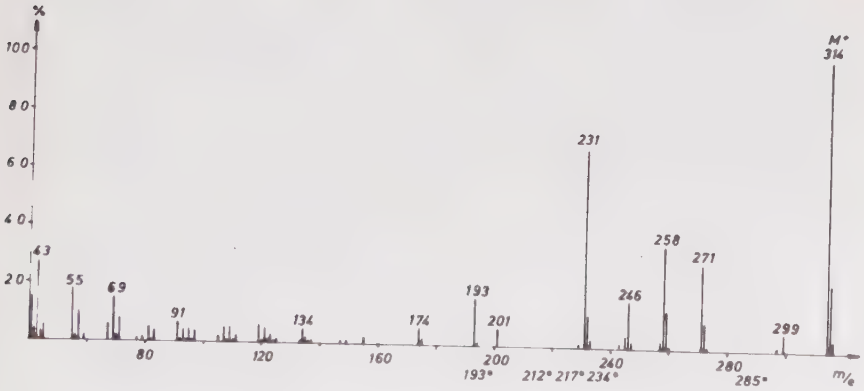


Abb. 32 : Massenspektum des $\Delta^{1(6)}$-THC

20. Weitere Cannabinoide im Haschisch (XVII - XX)

Neben den abgetrennten einheitlichen Cannabinoiden erhielten wir im Verlauf der chromatographischen Trennungen viele Gemischfraktionen. Die Molekulargewichte derjenigen Verbindungen, die bei der Dünnschichtchromatographischen Übersichtsanalyse und in der Kopplung GC/MS bei der Auftrennung des Haschisch-Rohextraktes nachgewiesen wurden, sind im Experimentellen Teil aufgeführt.

Von einigen dieser bislang nicht näher beschriebenen Verbindungen konnte das MG durch Hochauflösung (peak-matching) bestimmt werden. Teilweise gelang es auch, Gemischfraktionen zu derivatisieren und durch Vergleich der Massenspektren vor und nach der Umsetzung dieser Fraktionen die Derivatbildungen anhand der charakteristischen Verschiebungen der Molekülionen eindeutig zu interpretieren. Auf diese Weise wurden die folgenden Cannabinoide gefunden:

	Summenformel	MG	Hauptspaltreaktion	gefunden im	Derivat
(XVII)	$C_{21}H_{24}O_4$	340	M-C_4H_9	Grünen Afghanen	1 x acetylierbar
(XVIII)	$C_{21}H_{28}O_4$	344	M-C_4H_9	Schwarzen Afghanen und Grünen Afghanen	1 x acetylierbar 1 x silylierbar
XIX)	$C_{21}H_{24}O_3$	324	M-15 (Basispeak)	Schwarzen Afghanen	nicht versucht
(XX)	$C_{21}H_{30}O_4$	346	M-15(Basispeak)	Grünen Afghanen	nicht versucht

B Cannabinoide im Rauchkondensat nach dem Rauchen von Haschisch

1. Bisherige Untersuchungsergebnisse :

Während hinsichtlich der Chemie von Cannabisinhaltsstoffen ein hoher Wissensstand erreicht ist (Tab. S. 6, Übersichten [3-5, 22]) wurde relativ wenig bekannt über die Zusammensetzung des Haschischrauches. Da Haschisch meist geraucht wird, sind nicht die Cannabisinhaltstoffe per se, sondern die Bestandteile des Rauches für die beobachteten psychotropen Effekte verantwortlich zu machen.

Die geringe Zahl der Arbeiten, die sich mit dem Haschischrauch beschäftigten [19-21, 92-94] ist erstaunlich, denn inzwischen liegen Ergebnisse vor, die beweisen, daß natürlicher Cannabisextrakt beim Rauchen eine stärkere Wirkung hat als eine seinem Gehalt entsprechende Menge an reinem THC. Vermutungen, daß pharmakologische Effekte auch anderen Cannabis-Inhaltsstoffen als den Cannabinoiden zugeschrieben werden müssen, sind geäußert worden [71]. Synergistische und antagonistische Effekte von Cannabinoiden und anderen Haschischinhaltsstoffen wurden diskutiert [5,18]. Untersuchungen über die Menge der beim Rauchen inhalierten Stoffe , die stark von der Rauchtechnik abhängen, wurden während der Entstehung dieser Arbeit von Agurell [21] und Miras [93] bekannt gegeben. Zwischen 30 und 80% der Cannabinoide gelangen durch den Hauptstrom in die Atmungswege. Diese Werte unterscheiden sich erheblich von den Angaben anderer Autoren. So berichten Claussen und Korte [92] , daß bei ihrer Versuchsanordnung 98% (!) des Harzes verbrannten.

Das Problem der chemischen Veränderung von Cannabisinhaltsstoffen beim Rauchprozeß wurde ebenfalls bearbeitet. Nach den

vorliegenden Ergebnissen kommt offenbar nur der Decarboxylierung von Cannabinoid-Säuren zu den entsprechenden neutralen Phenolen Bedeutung zu [92]. CBD soll beim Rauchen nicht zu den THC's cyclisieren [21]. Diese Umwandlung bliebe demnach auf säurekatalysierte [90, 96] und photochemische [95] Prozesse beschränkt. Eine Isonerisierung von Δ^1-THC in das stabile $\Delta^{1(6)}$-THC wurde nicht beobachtet [3, 92]. Versuche mit Haschisch aus Hanf, der in einer $^{14}CO_2$ Atmosphäre kultiviert worden war [93] zeigten, daß THC und CBD-Carbonsäure in unterschiedlichem Ausmaß durch den Rauchprozeß verändert werden, je nachdem, ob sie allein (pur) oder im Gemisch mit anderen Cannabinoiden geraucht wurden. Um weitere Klarheit über die offenbar komplexen Zusammenhänge zu erhalten, sind neuerdings Versuche eingeleitet worden [86], die Reinkomponenten des Haschisch zu pyrolisieren und die Reaktionsprodukte mit Hilfe chromatographischer Verfahren aufzuarbeiten, um dann ähnlich wie im Teil A dieser Dissertation dargelegt, mit Hilfe spektroskopischer Methoden die Struktur des Pyrolysats aufzuklären.

2. Problemstellung und Zielsetzung

Marihuana und Haschisch werden mißbräuchlich mit oder ohne Tabak vermischt, in Pfeifen oder in selbstgedrehten Zigaretten (Joints) geraucht. Der verbrennende Tabak produziert die erforderliche Hitze, um die flüchtigen Bestandteile des Harzes als Aerosol zu verdampfen. Aus Sparsamkeitsgründen werden beim puren Rauchen auch aus Stanniol geformte und durchlöcherte Einsätze in Pfeifenköpfe gesteckt [1].

Die Art und Menge der eingeatmeten Stoffe dürfte dabei von verschiedenen Faktoren wie z.B. : Pyrolysetemperatur , Feuchtigkeitsgrad, Sauerstoffzufuhr, Verteilung des Haschisch im Tabak, sowie der Rauchtechnik usw. abhängen .

Da uns die Frage interessierte "was inhaliert ein Verbraucher beim Haschischrauchen", mußten wir einen möglichst natürlichen Rauchprozeß simulieren und das auf diese Weise erhaltene Rauchkondensat mit dem Ausgangsmaterial vergleichen.

3. Durchführung des Rauchversuchs

Mit käuflichem Tabak und etwa 300 mg zerkrümelten Haschisch wurden nach "Hascher-Art" jeweils eine filterlose Zigarette gedreht (insgesamt 200 Stck). Für diesen Versuch stand die gleiche Spezies Haschisch zur Verfügung, deren Gaschromatogramme in der Abb. 2a und 4 zu sehen sind. Um reproduzierbare und standardisierte Bedingungen zu schaffen, wurden die Zigaretten mit einer Rauchmaschine abgeraucht [+)], Exp. Teil). Das Kondensat wurde in Glasröhrchen elektrostatisch niedergeschlagen.

Um die aus dem Tabak stammenden Verbindungen erkennen zu können, rauchten wir in einem Blindversuch auch Zigaretten ohne Haschisch, in der gleichen Weise ab. Die so erhaltenen Teere wurden jeweils in Methylenchlorid und Tetrachlorkohlenstoff gelöst, von festen Bestandteilen abfiltriert und gelangten dann zur Analyse.

4. Analyse des Rauchkondensats

Das Abrauchkondensat wurde zunächst mit der GC/MS-Kombination untersucht. Dabei erhielten wir auf einer Glassäule normalen Durch-

---

+) Herr Dr. Brauert vom Staatlichen Chemischen Untersuchungsamt in Braunschweig war so freundlich, uns seine Abrauchmaschine für die Versuchsreihe zur Verfügung zu stellen.

messers (Ø 3mm) ein Gaschromatogramm, das dem des Ausgangsgemisches in der Abb. 2a entsprach. Die Aufnahme von Übersichtsspektren bestätigte die Anwesenheit der drei Hauptkomponenten CBD, THC und CBN. Daneben wurden mit Hilfe der im Teil A dieser Arbeit abgebildeten Massenspektren die Anwesenheit der folgenden Verbindungen festgestellt: I (Abb. 5), III (Abb. 12), VIII (Abb. 21) und XII (Abb. 25). Nach dem CBN-Peak wurde außerdem in geringer Menge eine Verbindung mit dem MG 348 eluiert, die weder zuvor im Haschischextrakt noch im Tabakrauchkondensat gefunden wurde.

Ein genaueres Bild darüber, wie die natürliche Cannabinoidzusammensetzung durch das Rauchen beeinflußt wird, gibt ein Vergleich der Kapillargaschromatogramme des Haschisch-Extraktes vor dem Rauchen (Abb. 4) und des entsprechenden Haschisch-Rauchkondensats (Abb. 33). Die durch Verbrennen des Tabaks entstehenden Verbindungen werden im wesentlichen erst vor und nach der Cannabinoidfraktion eluiert und stören somit bei der Auswertung nicht. Sie wurden durch Korrelation mit einem Kapillar-GC der Blindprobe (Teer aus dem Rauchversuch ohne Haschisch) ermittelt.

Bei der Betrachtung der Peaks für die Hauptcannabinoide fällt ein starkes Anwachsen des Δ^1-THC-Peak (11) relativ zum CBD (Peak 6) im GC des Rauchkondensats (Abb. 33) auf. Dieser Befund könnte in einem Zusammenhang stehen, mit den früheren Beobachtungen, daß erstens gerauchter Haschisch eine stärkere Wirkung hat als oral applizierter [99-101] und zweitens ein natürlicher Cannabisextrakt beim Rauchen ebenfalls stärker psychotrop wirkt als eine seinem Gehalt entsprechende Menge an reinem THC [5,18].

In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen [3, 92] kann die Umwandlung von Δ^1-THC in weniger aktives $\Delta^{1(6)}$-THC aufgrund des vorliegenden Gaschromatogramms ausgeschlossen werden, denn eine Zunahme des Peaks 10 ist nicht zu beobachten. In geringem Ausmaß steigt die Menge an Verbindung (III) im Peak 19. Der relativ hohe Peak Nr. 26 (Abb. 4 und Abb. 33) tritt auch im Gaschromatogramm des Tabakrauchversuchs ohne Haschisch auf und ist demnach kein typischer Haschischinhaltsstoff. Auf die Anwesenheit von nichtcannabinoiden Verbindungen (z. B. n-Alkanen) im GC eines Haschisch-Extraktes wird auch in einer kürzlich erschienenen Arbeit hingewiesen [106].

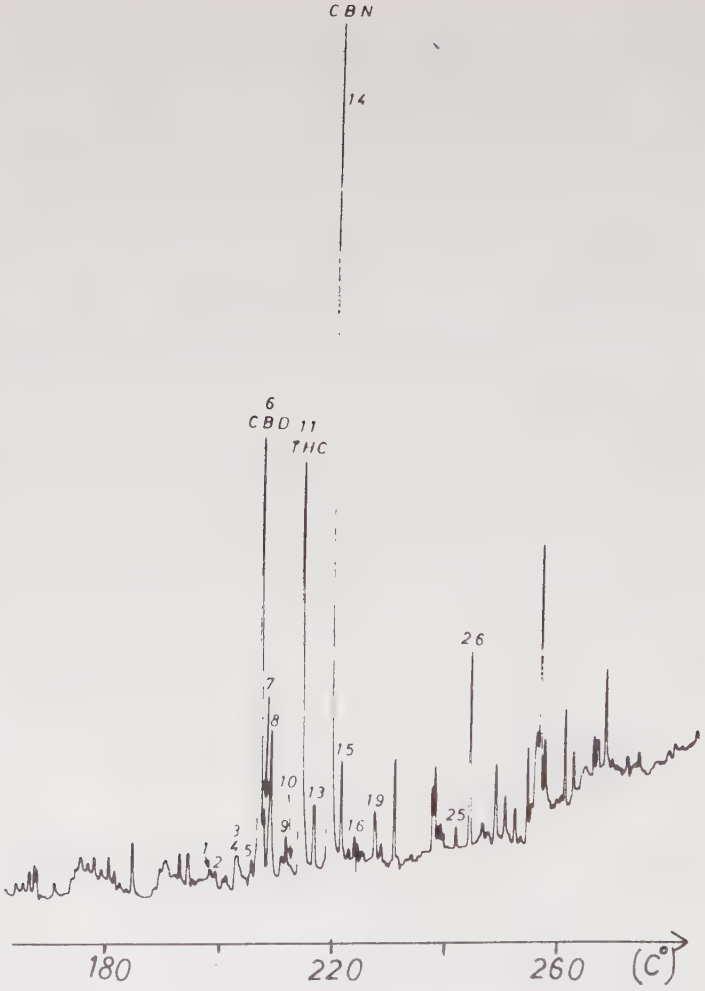


Abb. 33 : Kapillargaschromatogramm des Haschisch-Tabak-Rauchkondensats (Bedingungen im Exp.-Teil)

C Zum Nachweis von Cannabinoiden im Urin und Speichel nach Haschischkonsum

1. Bisherige Untersuchungsergebnisse

Für forensische und medizinische Zwecke (Rehabilitationszentren) wäre es von großem Nutzen, ein Verfahren zu erhalten, um den Abusus von Haschisch durch Analyse biologischen Materials nachweisen zu können.

Berichte über die Identifikation von Cannabisrauchern anhand einer DC-Analyse des Urin-Extraktes und das Auffinden unveränderter Haschischinhaltsstoffe wurden des öfteren publiziert [6-8, 104].
Hierbei konnte der Eindruck entstehen, es handele sich um eine sichere und allgemein anwendbare Nachweismethode.

In einigen Fällen gelangte Urin von Versuchspersonen zur Untersuchung, die entweder an einer Überdosis Haschisch gestorben waren [102], bewußtlos in die Klinik eingeliefert wurden [96] oder keine Angaben über die Menge des verbrauchten Haschisch machen wollten [96].

In einem anderen Fall konnte der dünnschichtchromatographische Nachweis von CBN erst nach vorhergegangener Behandlung des Urinextraktes mit p-Toluolsulfonsäure geführt werden [105].

Anderen Autoren gelang der Nachweis von Cannabinoiden im Urin nicht [9, 10, 84, 103].

2. Problemstellung und Zielsetzung

Da es sich bei den ausgeschiedenen Haschisch-Komponenten offenbar um sehr kleine Mengen handelt, bietet sich nach chromatographischer Vortrennung die Kopplung Gaschromatographie-Massenspektroskopie als am besten geeignete Methode an. Das Eluat der in der Literatur beschriebenen anfärbbaren DC-Zonen sollte entweder nach vorhergegangener GC-Trennung oder durch Direkteinführung ins Massenspektrometer auf seinen Cannabinoidgehalt überprüft werden.

3. Durchführung der Urinuntersuchungen

Zur Untersuchung gelangten etwa 20 Urinproben. Sie stammten zum einen von Personen, die in einem kontrollierten Reihenversuch [x] Haschisch geraucht hatten, und zum anderen von Probanden, die privat Haschisch konsumiert hatten. Drittens wurde Urin nach Selbstversuchen (orale Einnahme) aufgearbeitet. Wenn die Verarbeitung des zwischen 6 bis 30 Stunden nach Haschischgebrauch erhaltenen Harns nicht umgehend erfolgte, wurden die Proben auf $-20^{\circ}C$ eingefroren. Grundsätzlich wurde vor dem Haschischgenuß "Blind-Urin" zur Verfügung gestellt und parallel aufgearbeitet.

Die Aufarbeitung der Urine erfolgte nach den in der Literatur empfohlenen Verfahren, durch Extraktion des verseiften Urins (Exp. Teil). Für die DC-Trennung wurden verschiedene Laufmittelsysteme verwendet und zur Detektion der Zonen benutzten wir Echtblausalz B[68] Für Referenzzwecke ließen wir außerdem reines CBD, THC und CBN auf den DC-Platten mitlaufen.

---

x) Diese Versuche wurden von Dr. G. Döring am gerichtsmedizinischen Institut der Universität Göttingen durchgeführt.

4. Ergebnisse der Urinuntersuchungen

In keinem der untersuchten Urine konnten wir Cannabinoide nachweisen. In zwei Fällen wurden nach der DC-Trennung zwar Zonen erhalten, die sich mit Echtblausalz B rot anfärben ließen, jedoch zeigte die Untersuchung im Massenspektrometer, daß es sich hierbei nicht um Cannabinoide handelte, die sehr leicht an ihren Schlüsselbruchstücken oder Molekülionen zu erkennen gewesen wären, (Teil A dieser Dissertation).

Der Versuch, den Urinextrakt mit p-Toluolsulfonsäure zu dehydratisieren (Verfahren nach Andersen [105]) führte ebenfalls nicht zur Identifizierung von Cannabinoiden.

Da man zuweilen sogar bei cannabisfreien Kontrollurinen ein reiches Muster von Chromatogrammflecken erhält – wodurch eine Bewertung der DC-Analyse weiter erschwert wird – kommen wir zu dem Schluß, daß die in der Literatur beschriebenen DC-Nachweise von Cannabinoiden im Urin im Normalfall (Dosierung ungefähr 5 mg THC) wenig beweiskräftig sind.

Zu den gleichen Ergebnissen wie wir, gelangte auch die Gruppe Salaschek, Matte und Seifert, die sich in einer kürzlich erschienenen Arbeit [107] sehr kritisch mit dem zuverlässigen Haschisch-Nachweis im Urin befaßt.

5. Der Dansyl-Nachweis von Cannabinoiden im Urin und Speichel

Im Verlaufe unserer eigenen Bemühungen wurde ein weiterer Vorschlag zur Bestimmung von THC in biologischen Flüssigkeiten bekannt. Just, Werner und Wiechmann postulierten den Nachweis der THC's

in den Petrolätherextrakten des Speichels, des Blutes und des unverseiften (!) Urins [108]. Bei diesem Verfahren werden die THC-Isomeren mit Dimethylaminonaphthalinsulfonsäurechlorid (DANS-Cl) zu stark fluoreszierenden Sulfonsäureestern umgesetzt, die nach Dünnschichtchromatographie fluorometrisch bestimmt werden.

Auf Grund unserer eigenen Versuche mit der Dansyl-Methode und bei Berücksichtigung der inzwischen durch Experimente mit markierten Verbindungen bekannt gewordenen Erkennnisse über die Pharmakokinetik und den Stoffwechsel des THC gelangten wir zu folgendem Ergebnis [109] :

Der Nachweis von nicht metabolisiertem THC als Dansyl-Verbindung ist in Speichelproben am sichersten und sollte zweckmäßigerweise nur hier erfolgen. Wenn Speichelproben nach Aufarbeitung und Dansylierung wie früher beschrieben [108] untersucht werden, ist es angezeigt, einen positiven Fluoreszenznachweis durch Aufnahme eines Massenspektrums zu sichern. Für ein Massenspektrum sind mindestens 10^{-10} Mol DANS-THC erforderlich. Mit ähnlichen R_F-Werten wie DANS-THC chromatographiert DANS-Cannabinol (CBN). Die Massenspektren dieser beiden Verbindungen sind in den Abbildungen 34 und 35 reproduziert. Die früher angegebenen massenspektroskopischen Daten [108] beziehen sich auf ein solches Gemischspektrum, das außerdem mit anderen Verbindungen verunreinigt war.

In der Regel ist (abhängig von der Menge und dem Gehalt des gerauchten Haschisch) bis zu einer Stunde nach dem Rauchen noch genügend THC im Speichel, um ein Massenspektrum des Dansyl-Derivates zu erhalten und somit eindeutig den Abusus von Haschisch zu beweisen. Ein massenspektroskopischer Nachweis von THC als

DANS-Derivat im Urin nach dem Rauchen einer Zigarette (400 mg Cannabis entsprechend 6 mg THC) gelang uns nicht. Diese Ergebnisse sind verständlich, denn inzwischen konnte durch Versuche mit ^{14}C-THC nach Injektion gezeigt werden, daß Haschischraucher unter dem Gesichtspunkt des Gesamtstoffwechselweges nur unerhebliche Mengen an freiem THC ausscheiden. [110-112, 114]. In der Regel erfolgt die Ausscheidung über den Stuhl [14, 112]. Schon 10 Minuten nach der Injektion von THC wird es fast vollständig metabolisiert [111]. Nach der Aufarbeitung großer Mengen gelang es Wall und Mitarb. [113] aus menschlichem Plasma vier hydroxylierte THC-Metaboliten zu isolieren.

Das Glucoronid von 7-OH-THC wurde ebenfalls im Urin von Rauchern gefunden, nachdem vier Versuchspersonen im Verlauf von 12 Stunden jeweils 5 g Haschisch (!) geraucht hatten und ihr Gesamturin nach enzymatischer Hydrolyse aufgearbeitet wurde [116].

In jüngster Zeit ist die Massenfragmentographie Basis einer zuverlässigen und empfindlichen Methode zum Nachweis des THC's im menschlichen Plasma geworden [115]. Mit THC-d_2 als internem Standard konnte gezeigt werden, daß der THC-Gehalt 2 Stunden nach dem Rauchen etwa 5 ng/ml beträgt.

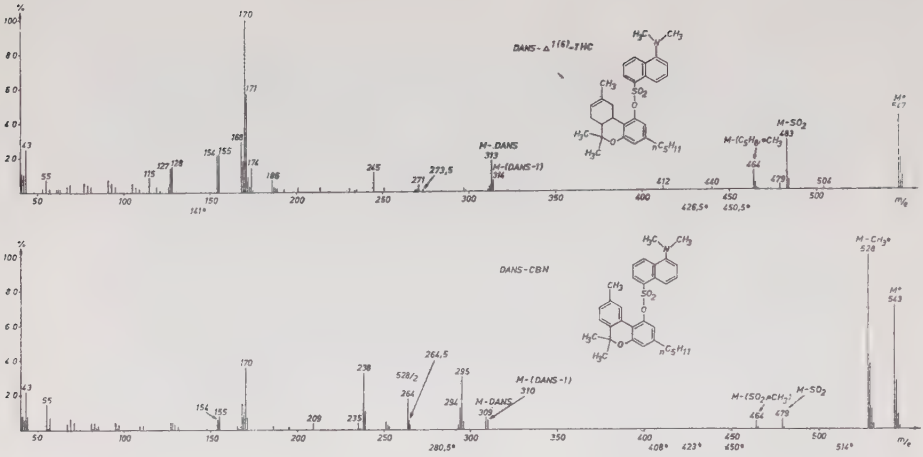


Abb. 34 : Massenspektrum des Dansyl $\Delta^{1(6)}$-THC

m/e	Bruttoformel	Bemerkungen
547 (M^+)	$C_{33}H_{41}O_4NS$	
483	$C_{33}H_{41}O_2N$	vergl. Sulfonamid-Derivate [117,118] u. phenol. Sulfonsäureester [119]
464	$C_{27}H_{30}O_4NS$	Dienzerfall, Verlust v. $\cdot CH_3$ vergl. THC (Abb. 32) und Lit. [75]
314/313	$C_{21}H_{30}O_2/C_{21}H_{29}O_2$	M^+-DANS, vergl. Lit. [119-121]
171/170	$C_{12}H_{13}N/C_{12}H_{12}N$	typisch für DANS-Verbindungen, Lit. [119-121]

Abb. 35 : Massenspektrum des Dansyl-CBN

543(M^+)	$C_{33}H_{37}O_4NS$	
528	$C_{32}H_{24}O_4NS$	Verlust v. $\cdot CH_3$ vergl. CBN (Abb. 11) und Lit. [75]
479	$C_{33}H_{37}O_2N$	vergl. Sulfonamid-Derivate [117,118] u. phenol. Sulfonsäureester [119]
464	$C_{32}H_{34}O_2N$	Verlust von SO_2 und $\cdot CH_3$
310/309	$C_{21}H_{26}O_2/C_{21}H_{25}O_2$	M^+-DANS, vergl. Lit. [119-121]

Zusammenfassung

A. Isolation und Strukturaufklärung einiger neuer Cannabinoide aus Haschisch

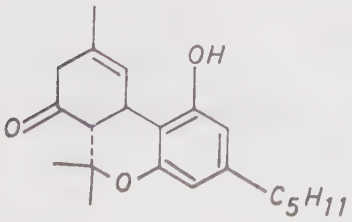
Bei unseren Versuchen stellten wir fest, daß eine vollständige Trennung des Cannabinoidgemisches aus Haschischproben mit Hilfe einer normalen gaschromatographischen Säule oder allein mit dünnschichtchromatographischen Verfahren nicht möglich ist.

Dagegen läßt sich mit einer Glaskapillarsäule eine viel höhere Trennleistung erzielen, was insbesondere für die Bewertung des Tetrahydrocannabinol (THC)-Gehalts im Haschisch von Bedeutung ist. Das aktive Δ^1-THC kann mit dieser Säule von seinem weniger aktiven $\Delta^{1(6)}$-Isomeren getrennt werden.

Durch Kombination von Gas- und Dünnschichtchromatographie mit der Massenspektrometrie wurde gezeigt, daß Cannabis-Extrakte eine Reihe bisher unbekannter Cannabinoide enthalten.

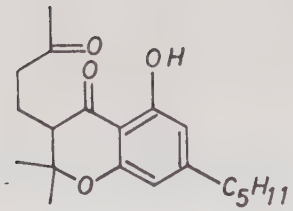
Einige dieser neuen Inhaltsstoffe wurden durch mikropräparative Gaschromatographie und nachfolgender DC-Trennung isoliert und durch Aufnahme ihrer Massenspektren charakterisiert.

Die Auswertung spektroskopischer Daten (MS, NMR, IR und UV) sowie gezielte mikrochemische Umsetzungen mit nachfolgender Untersuchung der Reaktionsprodukte in der Kombination GC/MS erlaubten es, den Verbindungen (I), (II), (III), (V) und (VI) Strukturformeln zuzuordnen:



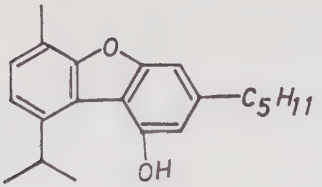
(I)

5-Oxo-Δ^1-tetrahydrocannabinol



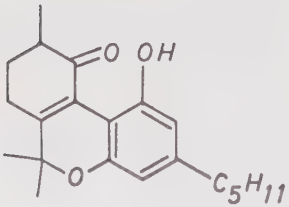
(II)

2,2-Dimethyl-5-hydroxy-3-(3-oxo-butyl)-7-pentyl-4-chromanon



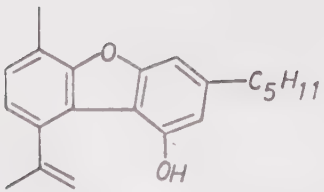
(III)

1-Hydroxy-9-isopropyl-6-methyl-3-pentyl-dibenzofuran



(V)

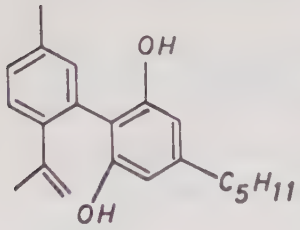
2-Oxo- Δ^3-tetrahydrocannabinol



(VI)

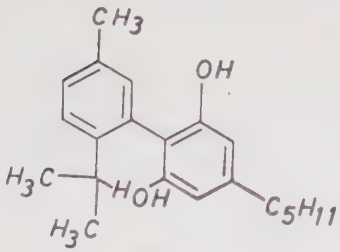
1-Hydroxy-9-isopropenyl-6-methyl-3-pentyl-dibenzofuran

Von diesen Verbindungen ist (III) vermutlich identisch mit dem kürzlich von Vree et al.[43] aus Haschisch isolierten Cannabinodiol (CBND), dem die Autoren jedoch die folgende Struktur zuteilten :

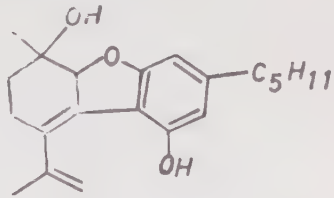


Cannabinodiol nach Vree et al[43]
CBND

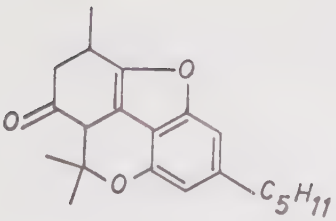
Für die Cannabinoide (IV), (IX) und (XIV) wurden ebenfalls Strukturvorschläge gemacht, die jedoch nach Anreicherung durch weitere spektroskopische Messungen abgesichert werden sollten.



(XIV) 4-Isopropyl-cannabinodiol



(IX) Dehydrocannabielsoin



(IV)

5-Oxo-Δ^2-furano-tetrahydrocannabinol

Die Verbindungen (XI) [S. 56] und (XII) [S. 57] sind jeweils isomer zu den genannten Verbindungen (I) und (IV).

Nur Teilstrukturen wurden für die Komponenten (VII) [S. 50] und (X) [S. 54] ermittelt.

Die Anwesenheit vier weiterer Verbindungen (XVII), (XVIII), (XIX) und (XX) wurde nachgewiesen [S. 68].

Aufgrund der Massenspektren und durch Derivatbildung kann die während der Entstehung dieser Dissertation von anderen Gruppen veröffentlichte Strukturableitung für die Propylhomologen des CBN und THC bestätigt werden.

B. Cannabinoide im Rauchkondensat nach dem Rauchen von Haschisch

Zur Überprüfung der Auswirkungen des Pyrolyseprozesses auf die ursprüngliche Cannabinoidzusammensetzung wurden Haschischzigaretten mit einer Rauchmaschine abgeraucht. Durch kapillargaschromatische Analyse konnte ein starkes Anwachsen des Δ^1-THC Peak relativ zum CBD beobachtet werden.

In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen [3, 92] wurde eine Umwandlung von Δ^1-THC in weniger aktives $\Delta^{1(6)}$-THC nicht festgestellt.

C. Zum Nachweis von Cannabinoiden im Urin und Speichel nach Haschischkonsum

Wir setzten uns kritisch mit dem zuverlässigen Haschischnachweis im Urin und Speichel nach Cannabisgenuß auseinander. Die in der Literatur vielfach geweckten Hoffnungen, den Abusus von

Haschisch durch Auffinden nativer Cannabinoide nach DC-Analyse von Urin-Extrakten nachweisen zu können, beruhen auf Fehlinterpretationen oder auf wenige Fälle mit ungewöhnlich hohen Dosierungen.

Das Dansyl-Verfahren [108, 109] ist für die Analyse des Speichels zwar bis zu einer Stunde nach dem Haschisch-Rauchen geeignet, sollte jedoch durch Aufnahme von Massenspektren abgesichert werden.

EXPERIMENTELLER TEIL

I. Übersichtsanalysen der Haschischproben

1. Extraktion von Haschisch

Zur Untersuchung gelangten zwei beschlagnahmte Haschischproben unbekannter Herkunft, dem Aussehen nach handelte es sich um den "Schwarzen Afghan"(1) (schwarz und weiche Konsistenz) und den "Grünen Afghan" (2) (grau-grün, trockener und spröder als (1).

Jeweils 5 g der Proben (1) und (2) wurden mit einem Mixgerät pulverisiert, 6 mal bei Raumtemperatur mit je 50 ml Cyclohexan im Kolben per Hand geschüttelt (ca: 30 sec.) und vom Rückstand abfiltriert. Das Lösungsmittel der vereinigten Filtrate wurde am Rotationsverdampfer bei 30°C abdestilliert. Es verblieben braunschwarze Öle, die im Exsikkator 24 Stdn. getrocknet wurden und zur Auswaage gelangten. Für die chromatographischen Übersichtsanalysen konnten so zwei Substrate gewonnen werden : aus (1) 1,1 g [E-1] und aus (2) 0,7 g [E-2]. Der bereits mit Cyclohexan ausgezogene pulverisierte Rückstand von (2) wurde mehrmals mit heißem Methanol behandelt und abfiltriert. Auf diesem Wege erhielt ich eine geringe Menge (0,02 g) zusätzliches Öl (3) [E-3] für die gaschromatographische Analyse. Die Extrakte wurden bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei -20°C in der Kühltruhe aufbewahrt.

Für die Gaschromatographie und Dünnschichtchromatographie stellte ich aus den Extrakten mit Chloroform/ Methanol etwa 10-proz. Lösungen her , die nach Gebrauch zur Vermeidung von Artefaktbildung unter Stickstoff eingedampft wurden.

2. Gaschromatographie - Massenspektrometrie

Die Proben wurden ohne Derivatisierung in der Kombination GC/MS untersucht. Die gaschromatographische Trennung erfolgte in einem Gaschromatographen der Firma Varian der Serie 1700. Als Trägergas diente Helium. Meist wurde bei einer Anfangstemperatur von 230°C mit einem programmierten Temperaturanstieg von 4°/Min. gearbeitet. Die Temperatur des Einlaßsystems betrug 300°C. Zur Trennung wurde eine analytische Säule mit Innendurchmesser 1,8 mm und 1.60 m Länge , als Säulenmaterial Chromosorb W, AW-DMCS, mit 3% OV-17 belegt[34], verwandt.

Der Gaschromatograph war über einen zweistufigen Separator vom Typ Biemann-Watson an das Massenspektrometer CH 7 der Firma Varian angeschlossen. Um die Substanzverluste möglichst niedrig zu halten, und Artefaktbildung zu vermeiden, war das gesamte System vom Probeneinlaß bis zum Einlaßrohr in die Ionenquelle des Massenspektrometers als Ganz-Glas-System ausgeführt und silanisiert. Als Detektor diente ein Totalionenanzeiger (10 Volt).

Von den Extrakten E-1, E-2 und E-3 erhielt ich die drei Gaschromatogramme in der Abbildung 2a, b, c .

Nach Aussage der Massenspektren befanden sich in den Peaks 3, 5 und 6 als Hauptkomponenten die Verbindungen CBD, THC und CBN. Die Anwesenheit weiterer Inhaltsstoffe war durch die in der folgenden Tabelle 1 aufgeführten Molekülionen angezeigt :

2.1 Tab. 1 : Ergebnisse der GC/MS Analyse

E-1 (Abb. 2b)

Vor Peak 1 : Phtalester und 284,282 (nicht C_3-CBN), 280,264, 256
" 1 : 286 (C_3-CBD), 314 (CBC)
" 2 : 286 (C_3-THC)
" 3 : 314 (CBD), 282 (C_3-CBN)
" 4 : 332 (II), 328 (I), 326 (IV)
" 5 : 314 (THC), 330, 328, 326 (XII), 310 (X)
" 6 : 310 (CBN), 328 (XI)
" 7 : 310 (CBN) und 310 (III), 330, 328 (V)
" 8 : 408
Nach " 8 : 346

E-2 (Abb. 2a)

Peak 2 : 314, 286
6 " 3 : 314 (CBD), 282 (C_3-CBN)
" 4 : 328 (I), 332 (II), 310, 326, 342
" 5 : 314 (THC), 330, 308
" 6 : CBN
" 7 : 330

E-3 (Abb. 2c)

(Nur Peaks, die nach dem CBN eluiert wurden, sind gemessen)
Peak 7 : 330, 328, 310 (III)
" 8 : 360, 346
Nach " 8 : 344, 372, 444

3. Dünnschichtchromatographie (DC)

Vorversuche hatten gezeigt, daß mit dem Verfahren nach Korte und Sieper [68] die Zonen am weitesten auseinandergezogen werden. Die Platten wurden mit Kieselgel G (Merck) 0,25 mm dick beschichtet und zwei Stunden bei 110°C im Trockenschrank aktiviert.

Die Imprägnierung der Platten erfolgte nach Abkühlung in Trögen, die mit einem Gemisch N, N-Dimethylformamid/Tetrachlorkohlenstoff (60 : 40) Vol. Prozent 1 cm hoch gefüllt waren. Eingelegtes Filterpapier gewährleistete die Kammersättigung. Nach etwa 1 Stde. wurden die vorbereiteten Platten herausgenommen und bei Raumtemperatur 1/2 bis 3/4 Stde. solange liegengelassen, bis die Kieselgel-Schicht eine hellgraue Färbung annahm. Auf die imprägnierten Platten wurden die Haschisch-Extrakte bandenförmig aufgetragen und sogleich mit Cyclohexan chromatographiert. Um eine gute Trennung zu erzielen, darf man auf eine Platte 20 x 20 cm nicht mehr als etwa 30 mg Rohextrakt auftragen.

3.1 Identifikation der Zonen

Für die Anfärbung war am geeignetesten Echtblausalz B (Merck) (Di-o-Anisidintetrazoliumchlorid) [68]. Es erlaubte eine bessere Unterscheidung der Zonen als das ebenfalls häufig benutzte 2,6-Dichlorchinondiimid (1% in Äthanol) [7], welches die Zonen in verschiedenen Blautönen anfärbt.

Die Bereitung einer Sprühlösung Echtblausalz B ist problematisch, denn sie darf erst unmittelbar vor Gebrauch hergestellt werden. Schon nach etwa 5 Min. färbt sich die Lösung braun, es bilden sich Flocken, und das Reagenz wird unbrauchbar; 10-20 mg Echtblausalz B wurden in 20 ml kaltem Wasser gelöst und abwechselnd mit einer 1/10 n-NaOH Lösung mit einem Sprüher aus 30 cm Entfernung auf die Zonen genebelt. Um den größten Teil der in den Zonen enthaltenen

Verbindungen zu isolieren, wurde nur ein schmaler Streifen besprüht, den ich zuvor durch einen Spatelstrich vom abgedeckten Teil der Platte abgetrennt hatte, um eine Diffusion der alkalisch wäßrigen Lösung zu vermeiden.

Bei optimaler Trennung erhält man das in der Abb. 1 (S. 10) gezeigte Chromatogramm mit den Zonen 1-11.

Der abgedeckte Teil der Platte wurde nach einer Kontrolle des Zonenverlaufs unter der UV-Lampe abgekratzt und mit Chloroform/Methanol (1:1) eluiert. Da sich hierbei immer eine geringe Menge Kieselgel löst, wurde das eingedampfte Eluat zum Schluß immer noch einmal mit Methylenchlorid aufgenommen und von nunmehr unlöslichen Kieselgelresten abfiltriert. Die auf diese Weise gewonnenen Substanzen gelangten entweder durch Direkteinführung oder mit der Kombination GC/MS zur massenspektrometrischen Untersuchung.

Als störend bei der direkten Einführung ins Massenspektrometer wurden schwerer flüchtige Reste des Imprägnierungsmittels DMFA empfunden, denn sie verursachten ein Ansteigen des Dampfdrucks im Massenspektrometer. Vorteilhafter war daher meist eine Untersuchung in der Kombination GC/MS, die zugleich eine Abschätzung der relativen Mengenverhältnisse der einzelnen Komponenten ermöglichte.

3.2 Ergebnis der DC-Trennung (vergl. Abb. 1)

Aus der GC/MS-Kontrolle ließ sich entnehmen, daß die folgenden Verbindungen zu etwa 80% einheitlich vorlagen: CBD (Z. 5), C_3-CBN (Z. 6), CBN (Z. 8) und THC (Z. 9). Ein hoher Peak m/e 44 und das Massenspektrum des CBD zeigten CBD-Säure in der Zone 1 an. Alle anderen Zonen enthielten komplexere Gemische.

Durch weitere Rechromatographien der einzelnen Zonen erhöhte sich

lediglich die Zahl der Gemischfraktionen, denn zum einen decarboxylierten mit der Zeit die als Säuren vorliegenden Komponenten und zum anderen wurde die Artefaktbildung durch den Zutritt von Luft, Licht und Wärme (Raumtemperatur) und das alkalische Milieu (DMF) gefördert. Wegen der Vielzahl von Isomeren mit den MG's 310, 314 und 328, verbunden mit der schlechten Reproduzierbarkeit dieses DC-Verfahrens war ein Arbeiten mit R_F-Werten nicht möglich. Stattdessen wurde meist mit den für mich wichtigeren Grenzen der Flecken von Vergleichssubstanzen gearbeitet.

4. Glaskapillar-GC

Als besonders wirksames Mittel zur Trennung des komplexen Substanzgemisches erwies sich die Glaskapillarchromatographie. Dabei wurde ein erst kürzlich in unserer Abteilung eingeführtes und modifiziertes [125] Gerät benutzt.

Gerät : Gaschromatograph Varian Aerograph 1400

Probe : Cyclohexan-Extrakt Grüner Afghan

Injektor : Modifizierter van den Berg und Cox Injektor [125]

Trennsäule : Dünnfilmglas-Kapillare, 36 m, Innendurchmesser 0,3 mm , belegt mit 3% OV-101.

Detektor : FID

Schreiber : Varian A 25

Die Bedingungen für das Gaschromatogramm Abb. 4 waren wie folgt :

Aufnahmebedingungen :

Gasdurchfluß : 1,5 ml Helium/min.

Injektortemp. : 280°C

Detektortemp. : 290°C

Säulentemp. : 100°C, (linear programmiert 6°C/min.) bis 290°C

Die Identifizierung der Peaks erfolgte mit Referenzcannabinoiden, die durch präparative Gaschromatographie/Dünnschichtchromatographie gewonnen wurden (vergl. II). Die GC-Profile waren bei Wiederholungsmessungen über eine Woche hinweg deckungsgleich. Die Referenzsubstanzen wurden zunächst allein injiziert, um ihren Reinheitsgrad abzuschätzen und dann zusammen mit der Stammlösung des Cyclohexan-Extraktes vom Grünen Afghanen (E-2) eingespritzt, die als Raster diente.

II. Isolierung der Verbindungen

1. Präparative Gaschromatographie

Die gaschromatographische Trennung der Rohextrakte E-1 und E-2 erfolgte in einem Gaschromatographen der Firma Varian (Serie 1700), der mit einem Flammenionisationsdetektor und Ganzglassystem ausgestattet war. Säulenlänge : 1,60 m, Säuleninnen Ø : 4mm. Stationäre Phase : 3% OV-17 auf Chromosorb G, AW-DMCS, belegt nach der Schalenmethode (vergl. unten). Temperatur des Einspritzblocks : 290°C, Detektortemperatur : 320°C, Trägergas : Stickstoff, 40 ml/min.

Bei einer Anfangstemperatur von 200°C und einem programmierten Anstieg von 4°/min fing ich die Fraktionen von 240-300°C, Peak 1-8, in Kapillarröhrchen auf. Aus 3 g Extrakt (E-2) wurden für die weitere Verarbeitung die folgenden Fraktionen isoliert :

Peak 1 (3 mg), Peak 2 (5 mg), Peak 3 (40 mg), Peak 4 (22 mg), Peak 5 (30 mg), Peak 6 (100 mg) Peak 7 (20 mg), Peak 8 (12 mg).

1.1 Behandlung, Belegung und Wartung der Säulen

Die mit Toluol und Methanol gereinigte und getrocknete Säule wird mit einer Lösung von 5% Dimethylchlorsilan in Toluol 2 Stdn. silanisiert

und dann nacheinander mit Toluol und Methanol gewaschen und getrocknet.

Für die Belegung werden 300 mg stationäre Phase (OV-17) mit 20 ml Toluol in einer Abdampfschale gelöst und 10 g Trägermaterial Chromosorb G, AW-DMCS, 80/70 mesh, eingestreut. Dabei muß die Schale so geschüttelt werden, daß alles Chromosorb gut durchfeuchtet wird. Mechanisches Rühren ist jedoch zu vermeiden, damit kein Abrieb entsteht. Das feuchte Chromosorb wird zunächst unter dem Abzug und dann im Trockenschrank (bis 100°C) getrocknet.

Besonders wichtig für eine hohe Trennleistung der Säule waren folgende Punkte :

1) Die Säule wurde langsam und lange genug konditioniert : ab 50°, 1°/min bis 200° bei schwachem Trägergasdurchfluß (10 ml/min), dann 12 Stdn. isotherm bei 200°C, dann 1°/min bis 320, und 24 Stdn. isotherm unter Erhöhung der Trägergasgeschwindigkeit auf 30 ml/min.
2) Damit der in den Injektor ragende Teil der Säule ausreichend durchlässig blieb, wurde er regelmäßig neu gestopft.
3) Abends wurde bei vermindertem Trägergasdurchfluß mit 100 µl MSTFA in drei Injektionen nachsilanisiert

2. Präparative Dünnschichtchromatographie

Die weitere Auftrennung der Fraktionen (Peak 1-8) erfolgte dünnschichtchromatographisch mit Kieselgel HF 254 (Merck) und Benzol als Laufmittel. Zwar ist Benzol nicht so trennstark wie das System nach Korte und Sieper (vergl. I/3), jedoch wird dieser Mangel dadurch kompensiert, daß der Zonenverlauf bei der Betrachtung mit der UV-Lampe (254 nm) exakt verfolgt werden kann, denn Cannabinoide löschen die Fluoreszenz. Ein Vorteil ist, daß mit Benzol als Fließ-

mittel reproduzierbare R_F-Werte erhalten werden, wodurch identische Verbindungen, die durch Überschneidung von GC-Peaks in benachbarte Fraktionen gelangt sind, nach der DC-Trennung leichter korreliert werden können.

2.1 Ergebnis der Präparativen DC

Folgende Chromatogramme wurden in der Reihenfolge ihres Auslaufes erhalten (Angabe der Molekülionen bzw. Formelnummern).

Aus :

Peak 1, 9 Zonen

Zone 2-9 enthielten sehr geringe Mengen und wurden nicht untersucht.

Hauptmenge in violett anfärbbarer Zone 1 (direkt über dem Start.) Sie enthält : 314, 326, 328, 330 und (XVIII).

Peak 2 7 Zonen

Zone 1 (viol.) : 302, 316, 330 XVIII
" 2 (viol.) : nicht untersucht
" 3 (rot) : " "
" 4 (rot) : " "
" 5 (viol) : XIV, XV, XVI
" 6 (viol) : XIII
" 7 (rot) : nicht untersucht

Peak 3 6 Zonen

Zone 1 (rot) : 314, II, 330 (Cannabielsoin I ?)
" 2 (rot-viol.) : II (80%), und I mit 314 (20%)
" 3 " : II (95%) und etwas I
" 4 " : XV (3 mg)
" 5 (rot) : CBD (15 mg)
" 6 (rötl.) : nicht untersucht

Peak 4 , 7 Zonen

Zone 1 (rotviol.) : II, VIII, IV
" 2 (viol.) : I (5 mg)
" 3 (rotviol.) : 310, s. wenig
" 4 (rotviol.) : nicht untersucht
" 5 (rot) : THC und 328
" 6 (rotviol.) : nicht untersucht
" 7 (") : " "

Peak 5 , 9 Zonen

Zone 1 (rötlich) : VIII
" 2 (violett) : I (5 mg)
" 3 (rötlich) : XII, XVIII
" 4 (scharl. rot) : THC, Spur CBN (durch Ox. entst.) (10 mg)
" 5 (rötlich) : THC, CBN, 326
" 6 (rötlich) : nicht untersucht
" 7 (rötlich) : " "
" 8 (rötlich) : XVII, V, 312
" 9 (dkl. viol.) : VII, Beimengung VI und X (4 mg)

Peak 6 8 Zonen

Zone 1 (nichtanfärbbar) : nicht untersucht
" 2 (" ") : " "
" 3 (violett) : XI (3 mg)
" 4 (nicht anfärbbar) : nicht untersucht
" 5 (" ") : " "
" 6 (dkl. violett) : CBN und Spur XVII (60 mg)
" 7 (rötlich) : Hochmolekulare Verbindungen 408, 354, XX, XIX ?
" 8 (violett) : III (5 mg)

Peak 7 9 Zonen

Zone	1-5	(rötlich)	: wenig Substanz, nicht untersucht
"	6	(rot)	: V (4 mg)
"	7	(rosa)	: 324, V, III
"	8	(dkl. viol.):	III (9 mg)
"	9	(rosa)	: hochmolekulare Verbindungen

Peak 8 7 Zonen

Zone	1-3	(nicht anfärbbar) :	nicht untersucht
"	4	(rosa)	: V
"	5	(rosa)	: V, XIX, CBN
"	6	(violett)	: CBN
"	7	(violett)	: III

Die meisten Verbindungen mußten vor der Aufnahme von Standard-massenspektren oder NMR-Spektren noch einmal chromatographiert werden.
Im allgemeinen wurden 50% der aufgetragenen Substanzmenge nach der DC-Trennung wieder gewonnen.

Artefaktbildung wurde beim CBD beobachtet: Bei der Reinigung von Zone 5 aus Peak 3 zeigten sich zwei neue Zonen unterhalb des CBD mit gelber bzw. blauer Eigenfärbung, die sich mit Echtblau salz B nicht anfärben ließen.
Die Verbindung (IX) (Massenspektrum Abb. 22) wurde in der Kopplung GC/MS erhalten nach Injektion der THC-haltigen Zone aus dem DC des Grünen Afghan.

III Charakteristik der Verbindungen

Alle neuen Cannabinoide wurden in öliger Form erhalten. NMR-Messungen in CCl_4 und TMS als interner Standard. IR-Spektren durch Aufnahme mit KBr und UV-Spektren in CH_3OH. Summenformeln wurden mit dem hochauflösenden Massenspektrometer (SM 1) durch "peak matching" gegen PFK (Perfluorkerosen) bestimmt (maximale Abweichung vom theoret. Wert : 2 ppm).

(I) 5-Oxo-Δ^1-tetrahydrocannabinol

MS : Abb. 5, S. 17 ; $C_{21}H_{28}O_3$

NMR : Abb. 6a, S. 21 ; δ 0.9 t, J = 6 Hz (aliph. $-CH_3$) ; 1,32 m (aliph. $-CH_2-$), 1.63 s (olef. $-CH_3$) ; 1,90 und 1.98 s (gem. CH_3) ; 2,41 d, J = 6 Hz (allyl $-CH_2-$) ; 2.60 t, J = 6 Hz (benzyl. $-CH_2-$) ; 6.39 s (olef. H, Doppelresonanz mit δ 1,63) ; 6.74 und 7.08 (2 arom. H, meta)

IR : 3390 cm^{-1} (phenol.-OH), 1705 cm^{-1} (gesätt. Carbonylgruppe im Ring)

UV: λ_{max} = 218,8 ; 252,9 ; 258,4 ; 280,7 ; 289,9 [nm]
Bei Zugabe von 1 Tropf. 2 n-NaOH : bathochrome Verschiebung.

Derivate : Hydrierung , MS Abb. 8 S. 22
Monoacetat, MS Abb. 7 S. 22
TMS-Äther, M^+ 400

(II) 2,2-Dimethyl-5-hydroxy-3-(3-oxo-butyl)-7-pentyl-4-chromanon

MS : Abb. 9 , S. 26 ; $C_{20}H_{28}O_4$

Derivate : Hydrierung, keine Aufnahme von Wasserstoff
Monoacetat, M^+ 374 ; Ausbeute : 30% (GC/MS-Kontrolle)
Methyläther, MS Abb. 10 , S. 27

(III) 1-Hydroxy-9-isopropyl-6-methyl-3-pentyl-dibenzofuran

MS : Abb. 12, S. 32 ; $C_{21}H_{26}O_2$

NMR : Abb. 13, S. 35 ; δ 0.9 t, J = 6 Hz (aliph. $-CH_3$) ; 1,31 d, J = 6,5 Hz (2 CH_3) ; 1,6 m (aliph. $-CH_2-$) ; 2.49 s (arom. $-CH_3$) ; 2.63 t, J = 7 Hz (benzyl-CH_2-) ; 4.32 sept. J = 6,5 Hz (isopropyl-H, Doppelresonanz mit δ 1.31) ; 5,15 br mit D_2O austauschbar (phenol.-OH) ; 6.34 und 6.91 (2 arom. H, meta) ; 7.04 s (2 arom. H, ortho)

Derivate : Monoacetat, M^+ 352
TMS-Äther, M^+ 382

(IV) 5-Oxo- Δ^2-furano-tetrahydrocannabinol

MS : Abb. 15, S. 37 ; $C_{21}H_{26}O_3$

Derivate : keine Acetyl-oder TMS-Gruppe einführbar

(V) 2-Oxo- Δ^3-tetrahydrocannabinol

MS : Abb. 16, S. 39 ; $C_{21}H_{28}O_3$

NMR : Abb. 17, S. 41 ; δ 0.88 t, J = 6 Hz (aliph. $-CH_3$) ; 1.24 s (gem. CH_3) ; 1.3-1.4 m (aliph. $-CH_2-$) ; 1.38 d, J = 6 Hz (C_1-CH_3) ; 2.46 t, J = 6 Hz (benzyl. $-CH_2-$) ; 6.11 und 6.28 (arom. H, meta) ; 9.72 s (scharf) mit D_2O austauschbar (phenol. OH)

IR : 3400 cm^{-1} (phenol.-OH) ; 1362 und 1385 cm^{-1} symmetrisch (gem. CH_3) ; 1650 cm^{-1} (α, ß-ungesätt. Carbonylgruppe)

Derivate : Hydrierung, MS Abb. 18, S. 45
Monoacetat, M^+ 370

(VI) 1-Hydroxy-9-isopropenyl-6-methyl-3-pentyl-dibenzofuran

MS : Abb. 19, S. 47 ; $C_{21}H_{24}O_2$

Derivate : Monoacetat, M^+ 350 ; TMS-Äther, M^+ 380
Hydrierung, M^+ 310, ident mit MS von III

(VII) Verbindung mit dem MG 324

MS : Abb. 20, S. 49 ; $C_{21}H_{24}O_3$

NMR : Cat-Aufnahme , unvollständig : δ 2.54 s (arom. CH_3) ; 2.66 t, J = 6 Hz (benzyl. $-CH_2-$) ; 4.53 und 4.75 s (endständ. $>C=CH_2$?)

Derivate : Hydrierung , keine Wasserstoffaufnahme
Monoacetat, M^+ 366 ; als Nebenprodukt M^+ 306, durch Wasserabspaltung aus (VII) entstanden ?

(VIII) Cannabielsoin-I

MS : Abb. 21, S. 53 ; $C_{21}H_{30}O_3$
ident. mit dem von Heerma et al. [86]

Derivate : Monoacetat, M^+ 372 ; TMS-Äther, M^+ 402

(IX) Dehydrocannabielsoin

MS : Abb. 22, S. 53 ; $C_{21}H_{28}O_3$

(X) Verbindung mit dem MG 310 aus dem Peak 5

MS : Abb. 23, S. 55 ; $C_{20}H_{22}O_3$
Derivat : Monoacetat, M^+ 352

(XI) Verbindung mit dem MG 328 aus dem Peak 6

MS : Abb. 24, S. 56 ; $C_{21}H_{28}O_3$
isomer zu II

(XII) Verbindung mit dem MG 326 aus dem Peak 5

MS : Abb. 25, S. 58 ; $C_{21}H_{26}O_3$

Derivate : Monoacetat, M^+ 368 , Methyläther M^+ 340

(XIII) Cannabichromen

MS : Abb. 26 , S. 62 ; $C_{21}H_{30}O_2$; Die Literaturangaben [52] sind falsch

Derivate : Methyläther, M^+ 328 ; Monoacetat , M^+ 356

(XIV) 4-Isopropyl-cannabinodiol

MS : M^+ 312 ; $C_{21}H_{28}O_2$

Derivat : Diacetat, MS. Abb. 28 , S. 64

(XV) Cannabivarol

MS : Abb. 29, S. 65 ; $C_{19}H_{22}O_2$

Derivat : Monoacetat , M^+ 324

(XVI) Tetrahydrocannabivarol

MS : M^+ 286 ; $C_{19}H_{26}O_2$

Derivat : Monoacetat, MS Abb. 30. S. 66

Die Verbindungen (XVII) - (XX) und ihre Derivate wurden in der Tabelle auf Seite 68 zusammengefaßt.

Von den bekannten Hauptkomponenten CBD, THC und CBN wurden nach Isolierung für Vergleichszwecke Spektren (MS, NMR) und Derivate (Acetate, Methyl- und TMS-Äther) hergestellt. Die Daten der NMR-Spektren sind in guter Übereinstimmung mit den in der Literatur [31] angegebenen. Die Massenspektren (Abb. 11, 27, 31 und 34) können als Standardmassenspektren betrachtet werden.

IV Herstellung der Derivate

1. Trimethylsilyläther

Die Derivatisierung erfolgte stets in einseitig spitz abgeschmolzenen Glasröhrchen von 5 cm Länge und 2 mm Innen Ø. Sie wurden jeweils nur einmal verwendet. Die Cannabinoidlösungen (meist Methylenchlorid wegen seiner leichten Flüchtigkeit) wurden mit einer µl-Spritze in die Spitze des Röhrchens gefüllt (etwa 10 µl). Das Röhrchen kam in ein Reagenzglas mit Schliff und wurde mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden. Die Dimensionen des Röhrchens waren so gewählt, daß bei 10 µl Füllung durch das Anlegen des Unterdrucks nichts herausspritzte. Nach 3 bis 5 Minuten war das Lösungsmittel abgesaugt und das Silylierungsröhrchen wurde herausgenommen. Die an der Glaswand verteilte Substanz wurde mit 10 µl N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA) [123] heruntergespült und das Röhrchen mit einem Bunsenbrenner zugeschmolzen. Der Silylierungsvorgang erfolgte während 2-3 Stunden bei 60°C im Wärmeschrank. Zur Entnahme der Probe bricht man das zugeschmolzene Ende ab. Die Proben wurden jeweils mit dem Silylierungsmittel zusammen in die Gaschromatographiesäule injiziert.

2. Phenolacetate

Die Acetylierung der Cannabinoidfraktionen erfolgte in den gleichen Röhrchen wie bei (1) beschrieben. Zur eingedampften Substanzlösung wurden 7 µl Acetanhydrid und 3 µl wasserfreies Pyridin (über KOH getrocknet)gegeben. Die Reaktion erfolgte bei 50°C in 3 Stunden. Zur Untersuchung in der GC/MS-Kombination wurde das gesamte Reaktionsgemisch eingespritzt.

3. Methyläther

Für die Methylierung wurde N, N-Dimethylformamid-Dimethylacetal (DMFDMA)[124] benutzt. Arbeitsweise wie bei (1) beschrieben. Reaktionsbedingungen 60°/3 Stdn.

4. Hydrierungen

Zur Hydrierung der olefinischen Ringdoppelbindungen wurde mit $Pd/CaCO_3$ (Merck) als Katalysator bei Raumtemperatur und Normaldruck gearbeitet. In der Regel wurden 200 µg des Cannabinoids in 3 ml Äthanol gelöst, mit einer Spatelspitze des Katalysators versetzt und über Nacht mit einem teflonbeschichteten Magneten gerührt. Zur Abtrennung der Lösung mit dem Reaktionsprodukt wurde etwas Glaswolle in den Hals eines kleinen Trichters gestopft und mit Kieselgel HR (Merck) 3 mm dick beschichtet. Zur Durchfeuchtung der Schicht wurden zunächst 2 ml reines Lösungsmittel (Äthanol)aufgegeben und dann erst die Reaktionslösung abfiltriert. Der feine Katalysator, der von Papierfiltern nicht zurückgehalten wird, durchdringt die Kieselgelschicht nicht. Nach Eindampfen der Lösungen gelangten die Produkte ohne weitere Reinigung durch Direkteinführung im Massenspektrometer zur Untersuchung.
Die Verbindung (VI) wurde in der gleichen Weise mit PtO_2/Äthanol hydriert. Die Kontrolle des Reaktionsproduktes erfolgte mit der Kombination.

V Rauchversuch

Verraucht wurden 200 selbstgedrehte filterlose Zigaretten mit einer Mischung Tabak und jeweils ~ 300 mg zerbröseltem Haschisch (Sorte Grüner Afghan).

Zur Kontrolle wurden ebenfalls 100 gleichartige Zigaretten ohne Haschisch geraucht.

Rauchbedingungen: Die Rauchmaschine (Hersteller Heinrich Borgwald, Hamburg) verrauchte jeweils 20 Zigaretten. Alle 40 sec. tat sie einen Zug von 2 sec. Dauer (Zugwiderstand 36 cm/sec). Aufgefangen wurde lediglich der Hauptstromrauch, der sich bei einer Spannung von 23 kV elektrostatisch in Glasröhren niederschlug. Jede Zigarette wurde bis auf einen 1 cm langen Stummel geraucht.

Von je 100 Zigaretten (mit und ohne Haschisch) erhielten wir etwa 3 g Teer. Das Kondensat wurde mit einem Gemisch CH_2Cl_2/CCl_4 [1 : 1] gelöst, von festen Bestandteilen abfiltriert und gelangte dann zur GC/MS-Untersuchung (Verfahren wie bei I/2) bzw. zur Glaskapillar-GC-Trennung (Verfahren wie bei I/4).

Die Bedingungen für das Gaschromatogramm Abb. 33, S. 74 (vergl. I/4) sind abweichend von denen in der Abb. 4 wie folgt:

Der Trägergasstrom wurde auf 2,5 ml/min erhöht.

VI Untersuchungen von Urin und Speichel

1. Extraktion des Urins

Die Urinproben wurden mit verd. Salzsäure, Natronlauge und Acetat-Puffer auf einen pH-Wert zwischen 3, 7 und 7, 5 eingestellt, je nach dem zur Anwendung gelangten Verfahren [7, 14, 110, 122]. Etwa 200 ml Urin wurden viermal mit je 70 ml organischem Lösungsmittel ausgeschüttelt. Als Extraktionsmittel fanden Petroläther [8, 13], Diäthyläther [14, 110, 111], Essigester [16] und Cyclohexan Verwendung. Die organischen Phasen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer abdestilliert. Wenn sich beim Ausschütteln Emulsionen bildeten, dann konnten die Phasen durch Zentrifugation getrennt werden.

2. Verseifung des Urins

a) mit Helicase

Nach dem Ausschütteln mit den oben aufgeführten Extraktionsmitteln wurden Reste der organischen Phase über Nacht mit Stickstoff ausgetrieben

Zur schonenden Verseifung von Cannabinoidkonjugaten wurden Enzympräparate (Glusulase) empfohlen [122]. Ich verwendete Ampullen mit Helicase, einem Extrakt von Helix pomatia (Weinbergschnecken) der Firma "Industrie Biologique Francaise", S. A. Gennevilliers.

Enzymaktivität pro Ampulle (1 ml) laut Herstellerangaben :

100000 Einheiten (Fishman) für Glucuronidase
800000 " (Roy) für Sulfatase

Die Verseifung dauerte 18 Stdn. bei 37°C in einem 0, 1 m

Natriumacetatpuffer unter Stickstoff.

b) mit Perchlorsäure

Ein Teil der Urine wurde mit 70 proz. Perchlorsäure pro 100 ml Urin 12 Stdn. bei 50° verseift [15, 104].

c) mit Salzsäure

Ein anderer Teil der Urinproben wurde nach dem Verfahren von Pohl 2 Stdn. mit 3% HCl auf dem Wasserbad verseift [8].

3. Aufarbeitung der Extrakte

Die organischen Phasen wurden nach der Extraktion auf 100 ml eingeengt und mit 1 g Natriumsulfat getrocknet [13]. Ein Teil der Extrakte wurde mit p-Toluolsulfonsäure und Benzol unter Rückfluß gekocht (Dehydratation nach Andersen et al[105]).

4. Chromatographie

Der eingedampfte Urinextrakt wurde mit wenig Methanol/Aceton aufgenommen und auf selbstbeschichteten Kieselgel G-Platten (Merck) mit den folgenden Laufmittelsystemen chromatographiert:

a) Cyclohexan mit imprägnierten Platten (wie unter I/3 beschrieben)

b) n-Pentan/ i-Pentan/Diäthyläther [50 : 35 : 15] auf Kieselgel G [8].

Die Platten wurden ggf. 2-3mal entwickelt. Zur Kontrolle ließ ich reine Cannabinoide (THC, CBD, CBN) oder Haschisch-Extrakte mitlaufen. Die den R_F-Werten der Referenzcannabinoide entspechenden Zonen wurden auch bei Nichtanfärbung mit der

Kombination GC/MS (vergl. 1/2) oder durch Direkteinführung im Massenspektrometer untersucht. Die für Cannabinoide typischen Schlüsselbruchstücke traten nicht auf.
Bei zwei Urinen (nach oraler Einnahme von 1 g Haschisch) fanden wir eine mit Echtblausalz B rot anfärbbare Zone direkt über dem Start. Laut Aussage des Massenspektrums (Molekülionen bei den Massenzahlen 168, 166, 152, 150) handelte es sich hierbei jedoch nicht um Verbindungen mit cannabinoiden Charakter.

5. Dansyl-Verfahren

Ein Teil der Urin-Extrakte wurde nach dem Dansyl-Verfahren [108,109] weiterverarbeitet (vergl. 5.1). Ebenso wurden Cyclohexan-Extrakte, die ich aus 3 ml Speichel bis zu einer Stunde nach dem Rauchen erhielt, nach folgender Methode (5.1) sinngemäß umgesetzt.

5.1 Darstellung der Dansyl-Derivate

(vergl. Abb. 34 u. 35)

10 mg des Phenols (bzw. des zu untersuchenden Extraktes) wurden in 1 ml Aceton gelöst und mit 0,5 ml einer gesättigten Sodalösung auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Mit 1 ml einer frisch bereiteten DANS-Cl Lösung (N, N-Dimethylaminonaphthalinsulfonsäurechlorid) in Aceton (Konzentration 15 mg/ml) und mit destilliertem Wasser wurde auf 4 ml verdünnt. Wichtig ist ein Aceton-Wassergemisch im Verhältnis [1 : 1]. Die Lösung wurde eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur und Kühlung mit einer Eis/Kochsalz-Mischung gerührt. Nach beendigter Reaktion waren kleine braune Tröpfchen DANS-Phenol als Emulsion zu erkennen. Der Überschuß an DANS-Cl wurde durch Hinzufügen einer Spatelspitze Prolin und 20 minütigem Rühren bei Kühlung beseitigt. Das Dansyl-Derivat

läßt sich dann mit Essigester extrahieren. Die organische Phase fluoresziert unter der UV-Lampe (254 nm) gelb und die wäßrige Phase (DANS-Cl und DANS-OH) hellgelb bis grünblau.
Das Reaktionsgemisch des Essigester-Extraktes wurde dann dünnschichtchromatographisch mit n-Heptan/Essigester [95 : 5] auf Kieselgel G-Platten (Merck) getrennt. Die Zone mit Dansyl-Phenolen fluoresziert unter der UV-Lampe (254 nm) intensiv hellgelb.

5.2 Bedingungen für die Spektren der Dansyl-Derivate (Abb. 34 und 35)

Das Spektrum des Dansyl-$\Delta^{1(6)}$-THC (Abb. 34) wurde mit einem Varian CH 7-Massenspektrometer aufgenommen (Direkteinlaß, 70 eV, Verdampf.-Temp. 210°C, Ionenquelle 120°C) und das des Dansyl-CBN (Abb. 35) mit einem Varian CH4-Massenspektrometer (Direkteinlaß, 70 eV, Verdampf.-Temp. 150°C, Ionenquelle 70°C) .

Es sei bemerkt, daß sich die Spektren je nach Gerät und Aufnahmebedingungen bezüglich der Intensitätswerte beträchtlich unterscheiden können. Bei Aufnahme mit einem Varian CH 7-Massenspektrometer unterden für Abb. 34 angegebenen Bedingungen ist das Verhältnis der Ionen der Masse 313 und 314 (100 : 40), bei Aufnahme mit einem Varian CH 4-Gerät (Direkteinlaß, 70 eV, Verdampf.-Temp. 125°C, Ionenquelle 50°C) gerade umgekehrt. Bei DANS-CBN betrifft dies insbesondere das Verhältnis der Ionen 309 und 310. Möglicherweise erfolgt im CH 4- Massenspektrometer teilweise Zersetzung oder es findet eine Umlagerung statt. Ähnliche Effekte zeigen Spektren anderer Autoren [120, 121].

(VII) Zur Aufnahme der Massenspektren

Die Massenspektren der Abbildungen 7, 10, 15, 19, 22 und 28 wurden in der Kombination GC/MS erhalten (vergl. I/2) Alle anderen Massenspektren wurden mit einem Varian CH 4 Gerät mit Hilfe eines heizbaren Direkteinführsystems aufgenommen.

Die Verdampfungstemperatur lag für die meisten Proben zwischen 60 und 70°C bei einem Dampfdruck von 10^{-6} Torr. Die Ionenquellentemperatur betrug 70-80°C.
Zur Ionisierung benutzten wir eine auf 70 eV stabilisierte Elektronenenergie.

Literaturverzeichnis

1) G. Stübing, Das öffentl. Gesundheitswesen 32 (8) 379 (1970)

2) United Nations Commission on Narcotic Drugs Document E/CN7/479 Sept., 1965 "The Question of Cannabis"

3) R. Mechoulam, Science 168, 1159 (1970)

4) T. Petrzilka, Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss. 27, 22 (1971)

5) C.R.B. Joyce u. S.H. Curry, "Botany and Chemistry of Cannabis", Churchill, London (1970)

6) J. Bonzani Da Silva, Rev. Fac. Farm. Bioquim. (S. Paolo) 5, 205 (1967)

7) G. Machata u. K. Kryspin-Exner, Wien, klin. Wschr. 82, 849 (1970)

8) K.D. Pohl, Arch. f. Kriminologie 147, 141 (1971)

9) R. Brand, Inaug.-Diss. Berlin (1969)

10) I.E. Manno, G.F. Kiplinger u. S.E. Haine, Clin. Pharmacol. Therap. 11, 6 (1970)

11) K. Kaiser, H. Obermann, G. Remberg, M. Spiteller-Friedmann u. G. Spiteller Mh. Chem. 101, 240 (1970)

12) G. v. Unruh, Dissertation, Göttingen (1972) und H.-J. Egger, Diplomarbeit, Göttingen (1973)

13) S. Agurell, i. M. Nilsson, A. Ohlsson u. F. Sandberg, Biochem. Pharmacol. 18, 1195 (1969)

14) S. Agurell, i. M. Nilsson, A. Ohlsson u. F. Sandberg, Biochem. Pharmacol. 19, 1333 (1970)

15) S. Agurell, i. M. Nilsson, A. Ohlsson u. F. Sandberg, Science 168, 1228 (1970)

16) S.H. Burstein, F. Menezes, E. Williamson u. R. Mechoulam, Nature 225, 87 (1970)

17) Z. Ben-Zvi u. R. Mechoulam, J. Am. Chem. Soc. 92, 3468 (1970)

18) R. Philips, R. Turk, J. Manno, N. Jain u. R. Fourney, J. forens. Sci. 15, 191 (1970)

19) C. Miras, S. Simos u. J. Kiburis, Bull. Narc. 16, 13 (1964)

20) U. Claussen u. F. Korte, Tetrahedron Letters 1967, 2067

21) S. Agurell u. K. Leander, Acta Pharm. Suecica 8, 391 (1971)

22) A. S. Curry, Advances in Forensic and Clinical Toxicology, C R C Press, Cleveland Ohio S. 33 (1972)

23) M. C. Nigam, K. L. Handa, I. C. Nigam u. L. Levi, Canad. J. Chem. 43, 3372 (1965)

24) E. Stahl u. R. Kunde, Tetrahedron Letters 1973, 2841

25) R. Hegnauer, Chemotaxonomie der Pflanzen, 3,350 Basel : Birkhäuser Verlag (1964)

26) Y. Obata u. Y. Ishikawa, Agr. Biol. Chem. (Japan) 30, 619 (1966)

27) A. F. Fentiman, R. L. Foltz u. G. W. Kinzer, Analyt. Chem. 45, 580 (1973)

28) C. A. Salemink, E. Veen u. W. A. de Kloet, Planta Med. 13, 211 (1965)

29) Literaturübersicht bei R. I. I. Ch. Lousberg, Chem. Weekblad. 8, 4 (1972)

30) L. Strömberg, J. Chrom. 68, 248 (1972)

31) R. Mechoulam u. Y. Gaoni, Fortschr. Chem. Org. Nat. 25, 175 (1967)

32) F. Korte u. U. Claussen, Z, Naturforsch. 21b, 594 (1966)

33) T. B. Vree, D. D. Breimer, C. A. M. van Ginneken u. J. M. van Rossum, J. Pharm. Pharmac. 24, 7 (1972)

34) D. H. Hunnemann, Beiträge zur gerichtlichen Medizin, Band 28 (1971), Verlag F. Deuticke (Wien)

35) T. B. Vreee, D. D. Breimer, C. A. M. van Ginneken u. J. M. van Rossum, " LKB" Publikation 1971

36) L. Vollner, D. Bienick u. F. Korte, Tetrahedron Letters 1969, 145

37) F. W. M. Merkus, Nature 232, 579 (1971)

38) Y. Shoyama, R. Oku, T. Yamouchi u. I. Nishioka, Chem. Pharm. Bull. 20 (9) 1927 (1972)

39) C. A. L. Bercht, R. J. J. Ch. Lousberg, F. J. E. M. Küppers, C. A. Salemink, T. B. Vree u. J. M. van Rossum, Journ. Chrom. 81, 163 (1973)

40) R. A. de Zeeuw, T. B. Vree, D. D. Breimer u. C. A. M. van Ginneken, Experientia 29, 260 (1973)

41) Fußnote 11 in : R. A. de Zeeuw, J. Wijsbeek, D. D. Breimer, T. B. Vree, C. A. M. van Ginneken, J. van Rossum, Science 175, 778 (1972)

42) T. B. Vree, D. D. Breimer, C. A. M. van Ginneken, J. M. van Rossum, R. A. de Zeeuw u. A. H. Witte, Clin. Chim. Acta 34, 365 (1971)

43) C. A. M. van Ginneken, T. B. Vree, D. D. Breimer u. J. M. van Rossum, Vortrag beim "International Symposium on Gaschromatography and Mass Spectrometry", Isle of Elba, Italy 17. Mai (1972)

44) R. Mechoulam, Z. Ben-Zvi, B. Yagnitinsky u. A. Shani, Tetrahedron Letters 1969, 2339

45) A. Cahn, J. Chem. Soc. 1342 (1932)

46) L. Ghosch, J. Chem. Soc. 1393 (1940)

47) R. Adams, M. Hunt u. J. H. Clark, J. Am. Chem. Soc. 62, 196 (1940)

48) R. Mechoulam u. Y. Shio Tetrahedron 19, 2073 (1963)

49) R. Adams, C. K. Cain, W. D. McPhee u. R. B. Wearn, J. Am. Chem. Soc. 63, 2209 (1941)

50) R. L. Hively, W. A. Mosher u. F. W. Hoffmann, J. Am. Chem. Soc. 88, 1832 (1966)

51) R. Mechoulam u. Y. Gaoni, J. Am. Chem. Soc. 86, 1646 (1964)

52) U. Claussen, F. von Spulak u. F. Korte, Tetrahedron 22, 1477 (1966)

53) R. Mechoulam u. Y. Gaoni, Chem. Commun. 20 (1966)

54) U. Claussen, F. von Spulak u. F. Korte, Tetrahedron 24, 1021 (1968)

55) R. Mechoulam u. Y. Gaoni, Tetrahedron Letters 1967, 1109

56) F. Korte, M. Haag u. U. Claussen, Angew. Chem. 4, 872 (1965)

57) T. Yamauchi, T. Shoyama, H. Aramaki, T. Azuma u. I. Nishioka, Chem. Pharm. Bull, 15, 1075 (1967)

58) R. Adams, Harvey Lect. Ser. 37, 168 (1941-42)

59) J. Kabelik, Z. Krejči u. F. Šantavý, Bull. Narcotics 12 (3), 5 (1960)

60) O. E. Schultz u. G. Haffner, Arch. Pharmaz. Ber. Deutsch. Pharmz. Ges. 291, 391 (1958)

61) R. Mechoulam u. Y. Gaoni, Tetrahedron 21, 1223 (1965)

62) Y. Gaoni u. R. Mechoulam, Proc. Chem. Soc. 82, (1964)

63) R. Mechoulam u. B. Yagen, Tetrahedron Letters 1969, 5349

64) T. Yamauchi, Y. Shoyama, A. Matsuo u. I. Nishioka, Chem. Pharm. Bull. 16, 1164 (1968)

65) Y. Shoyama, T. Fujita, T. Yamauchi u. I. Nishioka, Chem. Pharm. Bull. 16, 1157 (1968)

66) L. Crombie u. R. Ponsford, Chem. Commun. 894 (1968)

67) A. Shani u. R. Mechoulam, Chem. Commun. 273 (1970)

68) F. Korte u. H. Sieper, J. Chromatogr. 13, 90 (1964)

69) H. Aramaki, N. Tomiyasu, H. Yoshimura u. H. Tsukamoto, Chem. Pharm. Bull 16, 822 (1968)

70) F. W. H. M. Merkus, J. F. C. Roovers-Bollen in Symposium VI Chromatography and Electrophoresis, 14. -16. Sept. 1970, Presses Académiques Européenes. Brussels

71) F. W. H. M. Merkus, Pharm. Weekblad 106, 49 (1971)

72) M. R. Paris u. R. Paris, Bull. Soc. chim. France 1, 118 (1973)

73) C. G. Farmilo u. T. W. M. Davis, J. Pharmacol. 13, 767 (1961)

74) U. Claussen, H.-W. Fehlhaber u. F. Korte, Tetrahedron 22, 3535 (1966)

75) H. Budzikiewicz, R. T. Aplin, D. A. Lightner, C. Djerassi, R. Mechoulam u. Y. Gaoni, Tetrahedron 21, 1881 (1965)

76) A. F. Thomas u. B. Willhalm, Helv. Chim Acta 47 475 (1964)

77) R. Ryhage u. E. v. Sydow, Acta Chem. Scand. 17, 2025 (1963)

78) O. Gurny, D. E. Maynard, R. G. Pitcher u. R. W. Kierstead, J. Am. Chem. Soc. 94 7928 (1972)

79) R. Mechoulam, H. Varconi, Z. Ben-Zvi, H. Edery u. Y. Grunfeld, J. Am. Chem. Soc. 94, 7930 (1972)

80) G. Spiteller, "Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen", Verlag Chemie GmbH, Weinheim S. 276 (1966)

81) G. Spiteller, "Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen", Verlag Chemie GmbH, Weinheim S. 338 (1966)

82) Q. N. Porter u. J. Baldas, "Mass Spectrometry of Heterocyclic Compounds", Wiley-Interscience, a Division of John Wiley and Sons. Inc. New York, S. 83 (1970)

83) G. Spiteller, im Kapitel "Mass Spectrometry of Heterocyclic Compounds" S. 267 in "Physical Methods in Heterocyclic Chemistry", Vol. 3, Academic Press, Inc., New York and London (1971)

84) G. Machata, Arch. Toxikol. 25, 19 (1969)

85) M. E. Wall, D. R. Brine, G. A. Brine, C. G. Pitt, R. I. Freudenthal u. H. D. Christensen, J. Am. Che. Soc. 92, 3466 (1970)

86) W. Heerma, J. K. Terlouw, A. Laven, G. Dijkstra, F. J. E. M. Küppers, R. J. J. Ch. Lousberg u. C. A. Salemink. International Symposium on Mass Spectrometry inBiochem. and Medicine " Mario Negri, Milan, Italy 7. -9. Aug. 1973 (bei Tetrahedron im Druck)

87) Y. Shoyama, T. Yamauchi u. I. Nishioka, Chem. Pharm. Bull. 18, 1327 (1970)

88) Y. Shoyama, K. Kuboe, I. Nishioka u. T. Yamauchi, Chem. Pharm. Bull 20, 2072 (1972)

89) H. Williams u. J. Fleming, " Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie", Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 67 (1968)

90) Y. Gaoni u. R. Mechoulam, Tetrahedron 22, 1477 (1966)

91) E. W. Gill, W. D. M. Paton u. R. G. Pertwee, Nature 228, 134 (1970)

92) U. Claussen u. F. Korte, Liebigs Ann. Chem. 713, 162 (1968)

93) A. Coutsilinis u. C. Miras, J. of Forensic Medicine 18, 108 (1971)

94) F. Fish u. W. D. C. Wilson, J. of Forensic Science 9, 37 (1969)

95) A. Shani u. R. Mechoulam, Tetrahedron 27, 601 (1971)

96) W. Kisser, Arch. Toxikol. 29, 331 (1972)

97) M. Kraft u. G. Spiteller, Org. Mass Spectrometr. 1, 617 (1968)

98) B. Willhalm u. A. F. Thomas, Org. Mass Spectrometr. 1, 627 (1968)

99) A. T. Weil. Science Journal 5 A (3), 36 (1969)

100) L. Grinspoon, Scientific American 221 (6), 17 (1969)

101) H. Isbell, C. W. Gorodetzsky, D. Jasinski, U. Claussen, F. v. Spulak u. F. Korte, Psychopharmacologia 11, 184 (1967)

102) A. Heyndrick, Ch. Scheiris u. P. Schepens, J. Pharm. Belg. No. 7-8, 371 (1969)

103) F. Fish, Pharm. J. 209, 343 (1972)

104) M. J. Repetto, M. Menendez, Eur. J. Toxikol 3 (6), 329 (1971)

105) J. M. Andersen, E. Nielsen, J. Schou, A. Steentoft u. K. Worm, Acta pharm. Tox. 29, 111 (1971)

106) R. A. de Zeeuw, J. Wijsbeek u. Th. M. Malingré, J. Pharm. Pharmacol. 25, 21 (1973)

107) M. Salaschek, A. Matte, R. Seifert, J. Chromatogr. 78, 393 (1973)

108) W. W. Just, G. Werner u. M. Wiechmann, Naturwissenschaften 59, 222 (1972)

109) J. Friedrich-Fiechtl, G. Spiteller, W. W. Just, G. Werner u. M. Wiechmann, Naturwissenschaften 60, 207 (1973)

110) L. Lemberger, S. D. Silberstein, J. Axelrod u. I. J. Kopin, Science 170, 1320 (1970)

111) L. Lemberger, N. R. Tamarkin, J. Axelrod u. I. J. Kopin, Science 173, 72 (1971)

112) L. Lemberger, J. Axelrod u. I. J. Kopin, Pharmacol. Rev. 23, 371 (1971)

113) M. E. Wall, D. R. Brine, C. G. Pitt und M. Perez-Reyes, J. Am. Chem. Soc. 94, 8579 (1972)

114) M. Galanter, R. J. Wyatt, L. Lemberger, H. Weingartner, T. B. Vaughan u. W. T. Roth, Science 176, 934 (1972)

115) S. Agurell, B. Gustafsson, B. Holmstedt, K. Leander, J.-E. Lindgren, I. Nilsson, F. Sandberg u. M. Asberg, J. Pharm. Pharmacol. 25, 554 (1973)

116) E. J. Woodhouse, J. Publ. Health 62, 1394 (1972)

117) G. Spiteller u. R. Kaschnitz, Mh. Chem. 94, 964 (1963)

118) H. F. Grostic, R. J. Wnuk u. F. K. Mackelar, J. Amer. Chem. Soc. 88, 4664 (1966)

119) N. Seiler, H. Schneider u. K.-D. Sonnenberg, Z. Anal. Chem. 252, 127 (1970)

120) H. Egge, H. Ockenfels, H. Thomas, F. Zilliken, Z. Naturforsch. 26b, 229 (1971)

121) C. R. Creveling, K. Kondo u. J. W. Daly, Clin. Chem. 14, 302 (1968)

122) J. Christiansen u. O. J. Rafaelsen, Psychopharmacologia (Berl.) 15, 60 (1969)

123) J. Donike, J. Chromatogr. 42, 103 (1969)

124) H. Vorbrüggen, Angew. Chem., Int. Ed. 2, 211 (1963)

125) H. Luftmann, Dissert. Göttingen (1974)

Meinen Kollegen , der Dipl. -Chem. Frl. Ludwig und dem Dipl. -Chem. J. Reiner, danke ich für die Messungen der Kapillar-Gaschromatogramme. Insbesondere danke ich auch Herrn Dr. G. Remberg für die Messungen der zahlreichen hochaufgelösten Massenspektren. Weiterhin möchte ich mich bei Frau Salkowski für die Aufnahme der NMR-Spektren bedanken und bei Herrn Priv. -Doz. Dr. H. Lackner für die fördernden Diskussionsbeiträge bei der Auswertung der NMR-Spektren .

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Dr. G. Döring verpflichtet. Er besorgte mir mein Untersuchungsmaterial ; ohne seine Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Frau Schanz und Herrn Dipl. -Chem. E. Zietz verdanke ich die photographischen Arbeiten.

Lebenslauf

Am 27. 3. 1945 wurde ich in Attersee / Österreich als drittes Kind des Sportlehrers Joachim Friedrich-Fiechtl und seiner Ehefrau Elisabeth geboren. 1946 wurden wir als Reichsdeutsche aus Österreich vertrieben.

Von 1951-1955 besuchte ich die Grundschule und wechselte ein Jahr später auf das Neusprachliche Gymnasium in Duderstadt, wo ich im März 1965 das Abitur bestand.

Mit dem Sommersemester 1965 begann ich das Chemiestudium an der Georg-August-Universität in Göttingen, bestand im April 1969 die Diplom-Chemiker-Vorprüfung und arbeitete anschließend unter Anleitung von Herrn Professor Dr. G. Spiteller im Organisch-Chemischen Institut der Universität an meiner Diplomarbeit mit dem Thema "Ermittlung der Struktur einiger neuer Alkaloide im Muawin".

Im Oktober 1970 legte ich die Diplomprüfung für Chemiker ab. Danach arbeitete ich in Fortführung des Themas der Diplomarbeit an einer Publikation über Alkaloide aus Erythrophleum guineense.

Meine vorliegende Arbeit begann ich im Januar 1971. Nebenberuflich gebe ich seit Oktober 1970 Unterricht an der Chemotechniker-Schule in Hann. -Münden.

Seit Juli 1970 bin ich mit der Medizinisch-Technischen Assistentin Marianne Friedrich-Fiechtl, geb. Hußmann verheiratet.